N° d'ordre
47

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Francis TAYEAU

Licencié es-Sciences — Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille (Prix O.C.P.)
Chargé de Cours à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
né à Boulogne-sur-Mer (Pas-de-Calais), le 24 Novembre 1913

1re THÈSE — *Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin.*

2me THÈSE — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 2 Février 1939, devant la Commission d'Examen.

JURY :

Président : M. GENEVOIS, *Professeur.*
Examinateurs : MM. DEVAUX, *Professeur honoraire.*
MACHEBŒUF, *Professeur.*
DUFRENOY, *Maître de conférences.*
GLANGEAUD, *Maître de conférences.*

BOULOGNE-SUR-MER
Société Typo-Litho, 19, Rue Victor-Hugo
— 1939 —

N° d'ordre
47

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Francis TAYEAU

Licencié es-Sciences — Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille (Prix O.C.P.)
Chargé de Cours à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
né à Boulogne-sur-Mer (Pas-de-Calais), le 24 Novembre 1913

1re THÈSE — *Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin.*

2me THÈSE — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 2 Février 1939, devant la Commission d'Examen.

JURY :

Président : M. GENEVOIS, *Professeur.*
Examinateurs : MM. DEVAUX, *Professeur honoraire.*
MACHEBŒUF, *Professeur.*
DUFRENOY, *Maître de conférences.*
GLANGEAUD, *Maître de conférences.*

BOULOGNE-SUR-MER
Société Typo-Litho, 19, Rue Victor-Hugo
— 1939 —

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.
Doyen	MERCIER
Doyens honoraires	DUPONT
	CHAINE

PROFESSEURS HONORAIRES

BENARD
BOUNHIOL
DEVAUX
RICHARD
DUPONT
GUINCHANT
PICART
DAURE
CHAINE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PROFESSEURS

TROUSSET	*Mécanique rationnelle.*
MERCIER	*Physique générale.*
FEYTAUD	*Zoologie et Physiologie animale.*
DAGUIN	*Géologie et Minéralogie.*
DANGEARD	*Botanique.*
GENEVOIS	*Physiologie végétale et Chimie biologique.*
MILLOUX	*Calcul infinitésimal et Analyse supérieure.*
TRUCHET	*Chimie organique.*
QUÉLET	*Chimie minérale et Chimie physique.*
BRUS	*Chimie.*
BRELOT	*Mathématiques Générales.*
KASTLER	*Physique expérimentale.*
AVEL	*Zoologie.*

Maîtres de conférences honoraires	MANVILLE. ARRIVAUT.
Maîtres de conférences	GLANGEAUD, *Minéralogie.* ROUSSET, *Physique.* DUFRENOY, *Botanique.*
Maître de conférences adjoint	DE PUYMALY.
Secrétaire	ARTIGUELONG.

A MON PERE

A MA MERE

A MA GRAND'MERE

A MON FRERE

A MA BELLE-SŒUR

A MA FAMILLE

A MES AMIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536523_0064

A notre Maître

MONSIEUR LE PROFESSEUR MACHEBŒUF

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
DOCTEUR ES SCIENCES
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Nous sommes fier d'être son élève.

Au cours des années que nous avons passées auprès de lui, tant à la Faculté de Lille qu'à la Faculté de Bordeaux, nous avons pu apprécier, en même temps que l'étendue de ses connaissances, ses qualités de cœur et d'esprit, qui, dès le premier jour, nous avaient conquis.

Après nous avoir inspiré le sujet de cette thèse, il n'a cessé de nous prodiguer ses précieux conseils.

Les paroles ne sont pas à même d'exprimer notre pensée pour lui témoigner notre très profonde reconnaissance.

A notre Président de Thèse :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GENEVOIS

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA
FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

Hommage de respectueuse reconnaissance pour le bienveillant accueil qu'il a bien voulu nous réserver lorsque nous lui avons apporté le manuscrit de cette thèse, dont il nous a fait le grand honneur de bien vouloir présider le jury.

A nos Juges :

MONSIEUR LE PROFESSEUR DEVAUX

PROFESSEUR HONORAIRE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'INSTITUT
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Hommage de profond respect et de reconnaissance pour le grand honneur qu'il a bien voulu nous faire en acceptant de faire partie de notre jury.

MONSIEUR J. DUFRENOY

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

dont les conseils et les bienveillants encouragements nous furent toujours si précieux.
Témoignage de reconnaissance.

MONSIEUR L. GLANGEAUD

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

dont nous avons suivi l'enseignement avec tant de plaisir et d'intérêt.
Témoignage de reconnaissance.

A nos Maîtres :

MONSIEUR LE PROFESSEUR POLONOVSKI

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MEDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

qui fut notre maître à Lille et dont le prestigieux enseignement fit plus que tout pour nous attirer vers la biochimie.

Hommage de très respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR GIBERTON

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MEDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

qui guida nos premiers pas dans le laboratoire et qui n'a cessé, depuis lors, de nous témoigner ses encouragements.

Hommage respectueusement reconnaissant.

A nos Maîtres de la

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille

A nos Maîtres de la

Faculté des Sciences de Lille

A nos Maîtres de la

Faculté des Sciences de Bordeaux

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CHELLE

PROFESSEUR DE CHIMIE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Témoignage de reconnaissance pour le bienveillant intérêt qu'il n'a pas cessé de nous porter.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VITTE

PROFESSEUR DE PHARMACIE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Témoignage de vive reconnaissance pour son généreux appui.

A MONSIEUR LE DOYEN
ET MESSIEURS LES PROFESSEURS DE LA
Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DUBECQ

PROFESSEUR DE CLINIQUE ODONTO-STOMATOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
DOCTEUR ES SCIENCES

qui a bien voulu nous associer à son enseignement.
Respectueux hommage.

A MADEMOISELLE M. FAURE

ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

qui a bien voulu nous apporter son aide précieuse dans la réalisation de la partie immunologique de notre travail.

Témoignage de gratitude et de vive sympathie.

A nos Camarades du Laboratoire de Monsieur
le Professeur MACHEBŒUF

A MONSIEUR GEORGES BAIRE

INGÉNIEUR CIVIL DES MINES
CHIMISTE EN CHEF HONORAIRE DES LABORATOIRES DE LA SOCIÉTÉ
DES CIMENTS FRANÇAIS

qui a bien voulu mettre à notre disposition sa bibliothèque scientifique et nous encourager avec une si bienveillante amitié.

Hommage respectueux.

INTRODUCTION

L'analyse immédiate des tissus vivants caractérisa une longue étape des études biochimiques, elle conduisit à de splendides succès.

Un nombre considérable de constituants de la matière vivante furent isolés les uns après les autres et livrèrent aux chimistes les secrets de leur constitution. D'autres sont encore à découvrir, cela va sans dire, mais depuis longtemps déjà les biochimistes, voulant savoir plus encore, ont abordé l'étude des réactions chimiques qui évoluent dans les organismes vivants et là encore, de multiples succès sont venus couronner leurs patients efforts.

Mais une notion se précisa rapidement : les corps que l'on extrait à grand peine de la matière vivante n'ont pas toujours, lorsqu'ils sont purs, les propriétés physiques ou chimiques, ni les activités biologiques qu'on leur connaissait dans le tissu vivant. L'isolement et la purification leur ont fait perdre certaines qualités et le simple mélange, avec les autres constituants chimiques du tissu vivant dont ils proviennent, ne suffit pas toujours à leur rendre ces qualités.

Des biologistes en vinrent à nier aux chimistes le droit d'extrapoler de leurs résultats expérimentaux obtenus dans des tubes à essais ce qui devait évoluer au sein même des cellules vivantes. De nombreux principes immédiats isolés, cristallisés et purifiés à grand peine par les chimistes furent qualifiés d'artéfacts n'ayant aucun rapport avec la vie.

Ce n'est qu'après de patients travaux et après d'âpres discussions que l'on soupçonna l'importance des relations entre les divers constituants de la matière vivante.

Dans les cellules, dans les humeurs même, bien des consti-

tuants ne sont pas libres de toute attache comme ils le sont dans le tube à essais du chimiste qui les étudie après purification. Des liaisons de natures fort diverses unissent les uns aux autres les principes immédiats pour former des ensembles fort complexes qui sont les vrais constituants de la matière vivante. Les propriétés de ces ensembles ne rappellent parfois que d'assez loin les propriétés de leurs constituants ; certaines de ces propriétés peuvent y être exaltées (enzymes), d'autres peuvent y être atténuées ou même masquées complétement.

Cette conception ne fut admise qu'avec peine ; elle prévaut aujourd'hui unanimement. Certains même vont jusqu'à dire que le protoplasme d'une cellule vivante est une unique molécule groupant tous les constituants unis de ce protoplasme ; d'autres parlent de « molécules de sérum » en admettant que, dans le sérum sanguin, de nombreux constituants sont liés en un ensemble unique.

De telles affirmations, qui dépassent les faits, sont toujours la conséquence même du succès et de la fécondité d'une conception.

Mais que sait-on sur la nature des liaisons qui unissent ainsi les divers constituants des êtres vivants ? fort peut de choses. Quelques hypothèses assez peu solidement étayées ont seulement été proposées pour satisfaire notre légitime désir de rationalisation.

Parmi les chercheurs qui firent le plus pour préciser nos notions sur l'état des constituants de la matière vivante, il faut citer Soerensen, Przylecki, Willstatter, Machebœuf. Celui-ci a bien voulu nous associer à ses recherches en nous proposant d'étudier la stabilité des liaisons, qui unissent les lipides aux protéides dans le sérum sanguin. Le sérum sanguin est un objet d'études particulièrement commode ; son homogénéité et son état liquide sont précieux, point n'est besoin pour lui comme c'est le cas pour les cellules vivantes de soumettre l'objet d'étude à des manipulations préalables hasardeuses tendant à solubiliser les ensembles constitutifs de la matière vivante que l'on veut étudier ; point n'est besoin non plus d'une séparation de phases homogènes.

Les renseignements que l'on peut obtenir en étudiant l'état des lipides du sérum peuvent aider à concevoir l'état des lipides dans les cellules vivantes. Nous avons abordé avec joie cette étude et l'exposé de nos essais fait l'objet du présent travail.

CHAPITRE I

Brève étude historique et critique sur les protèides et les lipides du sérum sanguin

Brève étude historique et critique sur les protéides et les lipides du sérum sanguin

Les Protéides

Le sérum sanguin des divers mammifères contient près du dixième de son poids de protéides (90 à 95 grammes par litre chez l'homme adulte normal).

Dans le sérum sanguin, il existe plusieurs protéides et depuis longtemps déjà de nombreux auteurs se sont efforcés d'en séparer différentes fractions protéidiques en utilisant les méthodes les plus diverses.

Parmi celles-ci, les méthodes physiques d'insolubilisation fractionnée retiendront surtout notre attention, car elles ont abouti à des résultats physicochimiques et biologiques particulièrement intéressants.

Il semble que c'est à Panum (85) que revient le mérite d'avoir le premier démembré les protéides du sérum en deux grandes classes :

1° Protéides précipitant par dilution (avec ou sans addition d'acide acétique).

2° Protéides ne précipitant pas par dilution.

Plus tard, on chercha à modifier la méthode d'obtention de ces deux grandes fractions en remplaçant l'acide acétique par l'anhydride carbonique (99-113).

Les diverses fractions protéidiques du sérum sanguin devaient donc leurs définitions à leurs caractères de solubilité :

les « globulines » (SCHMIDT (99)) constituant la fraction insoluble dans l'eau en l'absence de sels, les « albumines » constituant la fraction soluble.

Peu après, HAMMARSTEN (37) montra que les caractères de solubilité envisagés ci-dessus étaient insuffisants pour définir les diverses fractions protéidiques, car suivant les conditions expérimentales les résultats obtenus étaient très différents.

C'est alors que les travaux d'HOFMEISTER (49) et de ses élèves (56) apportèrent quelques résultats nouveaux, qui permirent de préciser les données du problème du fractionnement des protéides sériques. Ces auteurs remarquèrent que par addition progressive de sulfate d'ammonium à du sérum sanguin, il se forme dès que la teneur en sel est suffisante, un précipité de protéides. Ce précipité augmente avec la concentration en sulfate d'ammonium. Puis, lorsque cette concentration correspond à peu près à la demi-saturation, le précipité n'augmente plus et il faut augmenter beaucoup la concentration saline pour qu'une nouvelle fraction protéidique précipite. Il existe donc au voisinage de la demi-saturation en sulfate d'ammonium un palier séparant deux fractions protéidiques distinctes.

Ces deux fractions furent recueillies et étudiées séparément. On constata qu'elles étaient très différentes et l'on appela « globulines » les protéides qui précipitent lorsque la concentration en sulfate d'ammonium atteint la demi-saturation et l'on appela « albumines », ceux qui restent solubles dans ces conditions.

Ces nouvelles définitions, qui sont encore couramment adoptées, obtinrent dès l'emblée un grand succès (89) et les biochimistes (27-91) s'efforcèrent même, à l'aide du sulfate d'ammonium, de définir de nouveaux paliers permettant la séparation d'autres fractions protéidiques intermédiaires.

Fractionnement des globulines

Les différences existant entre les globulines définies par SCHMIDT et celles définies par HOFMEISTER incitèrent MARCUS EMIL (77) à comparer ces deux fractions. Cet auteur remarqua que si l'on éliminait dans le sérum les globulines précipitant

par dilution, on obtenait encore un abondant précipité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Bien que la quantité de globulines obtenue par dilution subisse de grandes variations avec le temps et les conditions de l'opération, Marcus Emil appela « euglobulines », la fraction insoluble dans l'eau distillée et « pseudoglobulines » la fraction soluble dans ces conditions.

Peu après, Quinan (92) remarqua à son tour que si l'on met à dialyser du sérum pendant une semaine, la fraction protéidique qui s'insolubilise ne représente qu'une faible proportion des globulines, tandis qu'une bien plus grande partie reste en solution.

Spiro (91) puis Porges et Fuld (90) essayèrent de déterminer la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter au sérum pour ne précipiter que les globulines insolubles dans l'eau en l'absence de sels. Malgré le manque de netteté des zones critiques ainsi obtenues, ils convinrent d'appeler « euglobulines » les protéides précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et « pseudoglobulines » les protéides précipitant entre le tiers et la demi-saturation. *(1)*

On chercha à modifier et surtout à simplifier ces techniques et l'on proposa de nouvelles méthodes de séparation.

Certains préconisèrent de soumettre simplement le sérum à la dialyse contre de l'eau distillée légèrement acidulée et appelèrent « globulines » la fraction protéidique précipitant dans ces conditions.

D'autres appelèrent globulines les protéides précipitant par dilution du sérum au moyen d'eau saturée en anhydride carbonique.

Ces diverses méthodes de fractionnement donnent les résultats très différents et les fractions protéidiques obtenues, suivant les techniques, sont très variables.

(1) Notons dès maintenant l'imprécision du terme « euglobulines », qui, suivant les auteurs se rapporte à des fractions très dissemblables tant du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif et qui sont obtenues par des techniques de précipitation fort différentes.

Freund et Joachim (25), en 1902, avaient déjà noté à ce sujet que si l'on compare les euglobulines obtenues suivant la définition de Marcus Emil et celles obtenues avec le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, on n'a pas des fractions comparables.

De la non concordance de toutes ces méthodes d'obtention des globulines et du manque de précision des diverses appellations proposées naquit une confusion regrettable ; les résultats obtenus varient en effet dans d'énormes proportions suivant les techniques employées (75).

Fractionnement des albumines.

La fraction « albumines » du sérum sanguin apparut comme une individualité chimique beaucoup plus nette que les globulines lorsque Guerber (34) et Hofmeister (50) réussirent à l'obtenir cristallisée. Mais, dès que l'on essaya de la fractionner, soit en la soumettant à des températures de coagulation croissantes (36), soit en utilisant le sulfate d'ammonium (54-83-20-102), on s'aperçut que les albumines constituaient en réalité une fraction protéidique complexe. Il ne semble pas exister de limite de précipitabilité vraiment nette séparant des fractions bien distinctes parmi les albumines.

Robertson (94) conclut seulement à l'existence de deux fractions : l'une amorphe et l'autre cristallisée.

Toutes ces tentatives de fractionnement furent critiquées (26-101) et il semble difficile d'admettre l'existence de fractions albuminiques nettement distinctes.

Une différenciation nette existe par contre entre les globulines d'une part et les albumines d'autre part.

Comparaison des globulines et des albumines

Hammarsten (37) a dosé les divers éléments (carbone, hydrogène, azote, soufre et oxygène) rencontrés dans les globulines et dans les albumines. Les résultats obtenus pour ces deux fractions sont très voisins et ne peuvent pas servir à les caractériser.

Les résultats trouvés par Piettre (88), Achard et Grigaut (3),

Metzger (79), Malerba (76), Schultz (100), Moerner (80), Fleitmann (24) sont à peu près identiques à ceux d'Hammarsten.

Abderhalden (1) et ses élèves (2) ont déterminé la composition en chacun des acides aminés de la sérum globuline et de la sérum albumine de cheval ; ils ont constaté quelques différences appréciables : pour la cystine par exemple (1,5 p. 100 dans la sérum globuline ; 2,3 p. 100 dans la sérum albumine) et pour la proline (2,8 p. 100 dans la sérum globuline ; 1 p. 100 dans la sérum albumine).

On ne peut cependant accorder à ces chiffres qu'une valeur toute relative, car les chercheurs (35-57-28-47-82) qui se sont attaqués à ce problème ont trouvé des résultats fort variables par suite de la valeur plus ou moins discutable des méthodes utilisées.

Les molécules compliquées que sont les protéides ont un poids moléculaire très élevé. Grâce aux travaux de Svedberg (105-106), on sait que la sérum globuline de cheval a un poids moléculaire de 150.000, tandis que la sérum albumine du même animal a un poids moléculaire de 70.000. La nette différence qui existe entre les poids moléculaires de ces deux fractions corrobore le fractionnement en globulines et albumines, mais euglobulines et pseudoglobulines ont des poids moléculaires très voisins sinon égaux.

Les énormes grandeurs moléculaires des protéides leur confèrent des propriétés spéciales : état dit « colloïdal » en solution, passage impossible à travers les membranes poreuses à pores fins, cristallisation souvent impossible.

Svedberg *et* Sjœgren (107) ont remarqué qu'il suffisait de diluer la sérum albumine pour que les fractions nouvellement obtenues présentent des poids moléculaires très différents de celui de la fraction primitive, et il suffit de concentrer par ultrafiltration ces diverses fractions pour retrouver le poids moléculaire initial. Il ne faut d'ailleurs pas admettre comme générale à tous les protéides cette réversibilité qui n'existe pas dans le cas des sérum globulines par exemple.

Soerensen (103) pense qu'il existe des systèmes de composants ; ces composants seraient des chaines polypeptidiques formées d'acides aminés réunis par des forces de valence primaire (chaînes de valences principales). Ces espèces chimiques élémentaires seraient réunies en des sortes de polymères par des forces de valences secondaires et les différents polymères seraient enfin réunis entre eux par des forces analogues. Ces complexes pourraient d'ailleurs contenir d'autres constituants que des polypeptides, tels que des groupements phosphorés ou éventuellement des lipides. Soerensen suppose que ces systèmes évolueraient avec une facilité extrême d'une façon réversible en mettant en liberté certaines chaînes ou en échangeant entre eux différents constituants.

Cette conception semble particulièrement séduisante lorsqu'elle s'applique aux systèmes réversibles, mais, comme nous venons de le voir, tous les systèmes protéidiques ne sont pas réversibles. *(1)*

---

(1) Notons qu'il existe dans le sérum sanguin une petite quantité de glucoprotéides, qui par hydrolyse libèrent de la glucosamine et qui doivent être distingués des globulines ou des albumines, mais la teneur du sérum en ces glucoprotéides est assez faible et nos connaissances à leur sujet sont encore très limitées.

Les Substances lipoïdiques du sérum sanguin

Le sérum sanguin contient des quantités assez importantes de substances lipoïdiques (6 à 8 grammes par litre à l'état normal ; cette teneur peut augmenter considérablement chez certains malades).

Parmi les substances lipoïdiques, il y a des glycérides, des phosphatides, des stérides et des stérols. Ces substances sont toutes solubles dans l'éther et insolubles dans l'eau. Cependant, si l'on agite du sérum avec de l'éther, ce solvant n'enlève qu'une infime proportion des substances lipoïdiques totales (1 p. 100 environ).

Les substances lipoïdiques du sérum se trouvent donc dans un état particulier qui les rend hydrosolubles et inextractibles par leurs solvants habituels.

Afin de pouvoir expliquer cet état particulier, divers auteurs ont étudié le comportement de ces substances lipoïdiques, lorsqu'on les met en présence d'autres substances choisies parmi celles que l'on rencontre dans le sérum.

Thucidum constata le premier que la lécithine se gonfle dans l'eau en formant une suspension laiteuse qui, si l'on ajoute un alcali (58), est stabilisée mais le sérum et le sang sont presque neutres (pH 7,35).

Long et Gephart (66) montrèrent qu'il est possible de clarifier les suspensions laiteuses de lécithine par addition de sels biliaires, mais la concentration en sels biliaires nécessaire pour obtenir la clarification dépasse considérablement celle du sérum sanguin.

Le rôle des protéides prévu par Mayer et Terroine (78) fut étudié par Porges et Neubauer (90), qui montrèrent que l'addition d'albumines à des suspensions aqueuses de cholestérol et de lécithines conférait au mélange une certaine stabilité et ils attribuèrent à l'albumine le rôle de « colloïdes protecteurs » (Schutzkolloïde).

Ces suspensions aqueuses protéidiques ne sont pas limpides comme le sérum ; elles sont laiteuses et leur stabilité n'est pas très grande.

White (114) pensa qu'il existait des combinaisons instables autres que les esters entre le cholestérol et les acides gras et que ces combinaisons pourraient, dans certaines conditions, former des cristaux liquides tout comme certains esters de cholestérol ; dans cet état, les combinaisons lâches d'acide gras et de cholestérol pourraient se gonfler dans l'eau et même s'y émulsionner. Mais, les émulsions de cholestérol et d'acides gras, « en combinaisons lâches », obtenues par White laissent se déposer par repos leurs deux constituants, cholestérol et acide gras, à l'état cristallisé, ce qui n'a pas lieu pour le sérum. White ajoute que de semblables combinaisons lâches peuvent se former entre le cholestérol et la lécithine ; il pense que c'est sous la forme de telles combinaisons lâches avec les acides gras ou avec la lécithine, à l'état de cristaux liquides, que le cholestérol existe normalement dans les tissus animaux. *(1)*

Cette conception reçut la critique de Partington (87) qui nia l'existence de toute combinaison autre que les esters entre le cholestérol et les acides gras. En étudiant les courbes de refroidissement lent des mélanges de cholestérol et d'acides gras, cet auteur ne perçut jamais en effet de phase liquide anisotrope et ne rencontra pas d'autres formes cristallines que celles des acides gras et du cholestérol.

De plus, White n'obtint jamais une suspension aqueuse stable de cholestérol et d'acides gras, mais seulement des émulsions grossières laiteuses, dont l'aspect n'est nullement comparable avec celui du sérum.

Hattori (46) réussit en mélangeant en proportions déterminées du cholestérol à de la lécithine à obtenir un système solide homogène et il considéra que le cholestérol est en phase dispersée dans la lécithine constituant le milieu de dispersion. Hattori étudia l'influence de l'eau distillée et des solutions salines sur ces mélanges de cholestérol et de lécithine : il constata que si

(1) Cité d'après M. A. Macheboeuf, Etat des lipides dans la matière vivante Hermann édit.- Paris 1936.

l'eau distillée provoque la séparation du cholestérol et de la lécithine en deux phases distinctes, il n'en est pas de même pour les solutions salines isotoniques dans lesquelles se mettent en émulsion des globules mixtes cholestérol-lécithine.

En s'inspirant de ces faits, HATTORI émit une hypothèse sur le rôle du cholestérol et de la lécithine dans l'hémolyse par hypotonie, mais ces faits n'expliquent pas que le sérum contienne en phase aqueuse limpide et stable du cholestérol et divers lipides.

Si tous ces travaux montrent les actions réciproques que peuvent exercer entre eux les divers composants de la matière vivante ou du sérum, ils ne suffisent pas à nous éclairer sur l'état des lipides dans le sérum sanguin.

Stabilité en phase aqueuse des lipides du sérum

Depuis longtemps déjà, les biochimistes (52) avaient remarqué qu'il est impossible d'extraire les lipides du sérum par de simples lavages à l'éther où à la ligroïne ; ces liquides constituent cependant pour eux d'excellents solvants.

On pensa, sans pouvoir formuler une hypothèse précise, que les protéides devaient contribuer au maintien des lipides en phase aqueuse.

Bien avant les chimistes et les physicochimistes, les cytologistes (23-93-14-108-7-62-86-6) admirent l'existence de liaisons entre les lipides et les protéides dans les tissus vivants, surtout lorsque CIACCO (13) eut mis au point sa technique de « démasquage » des lipides des cellules. *(1)*

Pour le sérum, HARDY (41), HASLAM (45), CHICK (12), HARTLEY (44) pensèrent aussi qu'il pouvait exister des liaisons entre protéides et lipides sans pouvoir toutefois apporter de ce fait une preuve décisive.

(1) CIACCO soumet les protéides cellulaires à l'action d'une enzyme protéolytique. Il provoque ainsi une « lipophanérose » artificielle causée par l'hydrolyse enzymatique détruisant plus ou moins complétement les protéides cellulaires.

Comme les tissus, le sérum sanguin agité avec de l'éther ne livre à ce solvant qu'une infime partie de ses lipides.

Si l'on veut extraire la totalité des lipides sériques, il faut tout d'abord dénaturer les protéides par de l'alcool chaud et faire subir à ces protéides préalablement coagulés des lavages répétés à l'alcool et à l'éther.

Il existe cependant une méthode permettant de délipider le sérum sans dénaturer notablement les protéides. La technique due à Hardy et Gardiner (42) consiste à traiter le sérum préalablement refroidi à 0° par de l'alcool absolu refroidi à — 10°. Après un certain nombre de lavages, le précipité formé est bien deshydraté ; on l'épuise alors par de l'éther anhydre refroidi qui en enlève l'alcool puis finalement on l'épuise longuement par de l'éther à la température ordinaire.

Si l'on ne se laisse pas abuser par des mots, comme le fit autrefois Hansteen-Cranner (40), qui admit que les propriétés curieuses des lipides de la matière vivante étaient dues à un « état vivant » de ces lipides, on est obligé, en constatant une telle difficulté d'arrachement des lipides des tissus ou du sérum, de conclure que les lipides y sont liés à d'autres constituants de la matière vivante pour former des ensembles dans lesquels leurs propriétés de solubilité sont profondément modifiées.

Il fallait donc chercher quels étaient les constituants du sérum qui rendaient les substances lipoïdiques hydrosolubles.

Bang (4) soutint l'union du cholestérol avec les globulines, ce qui fut plus tard critiqué par Handowsky (38) qui montra que le précipité de globulines obtenu par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ne retenait que le quart environ du cholestérol total du sérum. Une grande partie de ce cholestérol reste au contraire dans ces conditions en solution avec les albumines (Young (117)).

Tronsegaard et Koudahl (110) isolèrent par acétylation de la sérum globuline des hydrocarbures semblables à ceux obtenus par acétylation du cholestérol.

Sans conclure comme ces auteurs que le cholestérol est un groupement prosthétique de la sérum globuline, on peut admettre que leurs résultats constituent un argument supplémentaire en faveur de l'existence de cholestérol dans les précipités de globulines même après purification soigneuse.

Peu de temps après, Theoreel (109), en étudiant le fractionnement des divers protéides plasmatiques, remarqua que tout le cholestérol se trouve entrainé dans l'ensemble des divers précipités protéidiques.

Ceci fut vérifié par Gardner et Gainsborough (30) qui dosèrent le cholestérol dans les globulines et dans les albumines.

Tous ces travaux sur l'état du cholestérol ne nous permettent pas de préciser si cet alcool est combiné à des protéides ou bien si son état physique particulier est dû à son union avec des substances non protéidiques pour former des ensembles hydrosolubles, qui seraient simplement entrainés par les protéides dans leur précipitation par le sulfate d'ammonium.

Pour être certain de l'existence de liaisons entre le cholestérol et d'autres constituants sériques, il fallait isoler des complexes lipidoprotéidiques.

Ce fut Machebœuf (69) qui réussit cet isolement.

On ne peut mieux faire pour exposer ses recherches que de reproduire le résumé qu'il en donne lui-même dans une récente monographie (68) : « pour tenter l'isolement de complexes lipidoprotéidiques, écrit Machebœuf, je me suis adressé à la solution des albumines et des lipides obtenue après précipitation des globulines ».

« J'ai d'abord montré que si l'on ajoute un peu plus de sulfate d'ammonium et de l'acide sulfurique dilué (N/5) jusqu'à ce que le pH soit 3,9, la précipitation des albumines et des lipides est à très peu près quantitative ».

« Fait très remarquable, le précipité obtenu se remet parfaitement en solution limpide si l'on ramène le pH à 7 ou au delà (neutralité), la précipitation des lipides est donc parfaitement réversible. Cette réversibilité est un argument nouveau en faveur d'un état très spécial des lipides, car pour toutes les émulsions aqueuses des lipides que l'on peut préparer artificiellement, une telle réversibilité n'est jamais constatée ».

« Lorsque l'ensemble albumines et lipides est ainsi remis en solution, grâce à de l'eau distillée et à la petite quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour ramener à la neutralité, on peut en acidifiant à nouveau à pH 3,8 ou 3,9 obtenir la précipitation d'une notable quantité de substances, mais comme la teneur en sels neutres est beaucoup moins élevée que lors de la

première précipitation des albumines, la majeure partie des protéides reste en solution. Le nouveau précipité est très riche en lipides, tous les lipides cependant ne sont pas précipités, il il en reste une fraction assez notable dans les eaux mères ; ce fait montre une fois de plus combien est grande la stabilité de l'état dissous de certains lipides qui restent ainsi en solution dans l'eau en présence de quantités assez notables encore de sulfate d'ammonium et en milieu acide (pH 3,8).

Le précipité qui est constitué de protéides et de lipides est encore parfaitement soluble dans l'eau, si l'on ramène le pH à 7 environ ».

« La réversibilité de la précipitation des lipides est complète et pourtant la quantité de protéides qui les accompagne est beaucoup moins forte que lors de la première précipitation. Après avoir dissous ainsi une deuxième fois le précipité dans de l'eau grâce à la quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour neutraliser, on peut opérer une troisième précipitation qui se fait en présence de moins de sels que la deuxième et ainsi on peut continuer une série de dissolutions dans l'eau à pH 7 (ou supérieur à 7) suivies chacune d'une précipitation par acidification à pH 3,8 ».

« Pour chaque précipitation, il reste dans les eaux mères les substances le moins facilement précipitables par acidification. Pendant les quatre ou cinq premières précipitations, le précipité s'enrichit en lipides et s'appauvrit en protéides mais, par la suite, sa composition reste à peu près constante et le contenu des eaux mères finit par avoir une constitution comparable à celle du précipité ».

« La fraction ainsi purifiée est très soluble dans l'eau en milieu neutre ou en milieu alcalin ; elle ne précipite pas dans ces conditions par addition de quantités mêmes notables de sels neutres (sulfate d'ammonium à demi-saturation, par exemple). Les solutions aqueuses sont parfaitement limpides et pourtant cette fraction si soluble dans l'eau est constituée par moins de 60 p. 100 seulement de protéides et plus de 40 p. 100 de lipides (phosphatides et stérides). Les solutions aqueuses agitées avec de l'éther ne livrent pas leurs lipides à l'éther, même en présence de sulfate d'ammonium ou de chlorure de sodium ».

« Bien plus, poursuit Machebœuf, si à une solution aqueuse de cette fraction à pH 7,4 par exemple (qui correspond à celui du sérum), on ajoute un excès d'alcool absolu, la précipitation des protéides est nulle si la solution est diluée ou seulement très incomplète si la solution est concentrée. Il faut, pour obtenir la coagulation des protéides, porter le liquide alcoolique à l'ébullition pendant au moins cinq ou six minutes. On parvient aussi à la coagulation totale des protéides par l'alcool même à la température ordinaire à condition d'attendre un nombre de jours parfois très grand ».

« En résumé, dans la fraction lipidoprotéidique ainsi extraite des albumines du sérum, non seulement les lipides sont solubles dans l'eau et sont masqués à leurs solvants (éther, benzène, etc...), mais en outre les protéides eux-mêmes sont masqués à leur réactif coagulant qu'est l'alcool ».

« Bien plus, parmi les lipides contenus dans la fraction étudiée, il est des esters de cholestérol très peu solubles à froid dans l'alcool à 80 %, ces stérides sont cependant, avec l'ensemble de la fraction, solubles dans ce solvant ».

Cette fraction, isolée par Machebœuf, contient donc une très grande proportion de lipides masqués à leurs solvants et de protéides masqués à leurs réactifs coagulants et elle ne contient pas autre chose que des lipides et des protéides.

Les esters du cholestérol, les phosphatides et les protéides se trouvent dans cette fraction dans un état tout à fait particulier qui les masque à leurs réactifs habituels.

Machebœuf proposa pour désigner les produits d'union des protéides avec d'autres constituants de la matière vivante le terme de « *cénapses* ».

La fraction précédemment envisagée constitue un exemple de cénapses lipidoprotéidiques, ensembles fort complexes créés par des forces d'union masquant ou modifiant certaines propriétés des corps unis.

Théories sur le mode d'union des lipides aux protéides

Un grand nombre de théories ont été proposées pour expliquer la nature des liaisons qui unissent les lipides aux protéides dans les cénapses.

Nous étudierons successivement les principales de ces théories en les subdivisant en deux groupes :

Théories chimiques et théories physiques.

Théories Chimiques.

Il est particulièrement difficile d'établir une limite entre les liaisons chimiques stables et les liaisons physiques de simple adsorption ou de solvatation, tous les intermédiaires pouvant exister (68).

Il semble actuellement impossible de fixer à ce sujet une limite précise entre la physique et la chimie et si nous qualifions de physique ou de chimique une liaison, c'est le plus souvent en nous basant simplement sur sa stabilité et sur la quantité d'énergie mise en jeu lors de sa formation ou de sa rupture. Aussi, les théories qui confèrent aux liaisons lipidoprotéidiques une grande stabilité seront-elles classées parmi les théories chimiques.

Hoppe Seyler (52), en 1867, remarqua que l'ovovitelline du jaune d'œuf perdait difficilement sa lécithine par action de l'alcool. Etant donné qu'en chimie organique, l'alcool est souvent insuffisant pour rompre les liaisons chimiques, Hoppe Seyler conclut que l'ovovitelline était une combinaison chimique de lécithine et de protéides.

De nombreux auteurs (63-21-22-110) se rangèrent à cette opinion, bien que l'on n'ait jamais pu démontrer l'existence de liaisons par valences primaires entre les lipides et les protéides.

Willstaetter et Rohdewald (115) pensent que les protéides sont susceptibles d'entrer énergiquement en combinaison, grâce

à la nécessité de saturer leurs affinités résiduelles. Ce sont des lipides, des glucides et d'autres principes peut-être même, qui satisferaient cette affinité en formant des complexes divers.

Il semble bien que de telles liaisons unissent le haem et la globine pour former l'hémoglobine, mais, affirmer comme le fait Willstaetter que lipides et protéides s'unissent en complexes de type wernérien, semble bien téméraire.

Soerensen (103), en 1930, ne crut pas pouvoir admettre l'existence de liaisons chimiques entre les lipides et les protéides ; il se basait sur les travaux de Hardy et Gardiner (42) qui ont montré que l'action successive de l'alcool refroidi à — 10° et de l'éther pouvait séparer les lipides des protéides. Soerensen pensa que l'alcool ne pouvait suffire à rompre une liaison d'ordre chimique. Cependant, les phénomènes d'alcoolyse de liaisons purement chimiques sont bien connus des chimistes.

Théories physiques.

Bang (9), en 1907, pensa que l'inextrabilité des lipides par l'éther s'explique par le fait que ceux-ci seraient emprisonnés au milieu des précipités protéidiques. C'est ainsi qu'il explique que les diastases protéolytiques peuvent libérer les lipides tissulaires en dissolvant leur guangue protéidique.

Walter (112) pensa que les « micelles colloïdales » lipido-protéidiques auraient leur couche superficielle constituée suivant les cas soit par des lipides soit par des protéides. Chez les végétaux, où cette couche superficielle serait lipidique, les enzymes protéolytiques resteraient sans action ; chez les animaux au contraire, la couche superficielle serait protéidique et serait attaquée par ces enzymes.

Degkwitz (15) a repris les hypothèses de Walter. Se basant sur les conceptions de Langmuir et Harkins (61-43), il établit une théorie hétérogène diphasique.

Degkwitz admet en effet que la matière vivante est constituée par deux phases : une phase graisse neutre et une phase eau. Les graisses seraient émulsionnées et stabilisées dans cet état par la présence de « colloïdes hydrophiles », comme les protéides, les polyosides et les phosphatides.

Cette théorie qui, au premier abord, semble attrayante s'appuie sur des données qui, comme l'a exposé Machebœuf (68), sont loin d'être démontrées : on n'a jamais pu déceler les deux phases, même par les méthodes les plus précises comme l'ultracentrifugation de Svedberg, or on sait que cette méthode permet de séparer des parcelles aussi petites que les molécules protéidiques elles mêmes.

Si la théorie de Degkwitz est maintenant rejetée, elle a eu tout au moins le mérite d'inciter certains auteurs à entreprendre des recherches, qui ont conduit à d'intéressants résultats.

Faisant opposition à ces théories qui ont tendance à considérer la matière vivante et le sérum comme un ensemble grossièrement hétérogène se place la théorie de Machebœuf et Sandor (71) basée également sur les conceptions physiques de Langmuir et Harkins (61-43).

Cette théorie, que les travaux les plus récents semblent confirmer, fut émise à la suite de recherches que nous allons brièvement exposer :

On savait que l'alcool et l'éther agissant simultanément pouvaient dans certaines conditions, délipider presque entièrement le sérum sanguin (42). D'autre part, Grigaut (32) avait constaté que l'éther pouvait extraire à peu près quantitativement le cholestérol du sérum, si ce dernier avait préalablement été additionné d'une quantité importante d'alcool.

Machebœuf et Sandor pensèrent qu'une étude plus détaillée de ces phénomènes pourraient leur apporter quelques notions nouvelles sur la stabilité des cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin.

Afin de ne pas dénaturer les protéides, ces auteurs n'opérèrent qu'en présence de très faibles quantités d'alcool. Ils ajoutèrent à du sérum de l'éther additionné d'un peu d'alcool. L'alcool diffusait alors progressivement de l'éther dans le sérum. Après un certain temps de contact, ils déterminèrent l'extrait éthérosoluble ainsi obtenu, ce qui leur permit de voir que l'éther alcoolisé, dans des conditions optimales qu'ils ont précisées, était susceptible d'enlever près de 60 p. 100 des lipides du sérum. *(1)* Ils étudièrent toutes les modalités de ce phénomène

(1) Divers alcools (méthylique, propylique, butylique et isoamylique) et l'acétone, comme l'a montré depuis lors Delage (16) dans le laboratoire de Machebœuf donnent des résultats identiques.

et en particulier l'influence du temps de contact entre l'éther et le sérum, car l'extraction des lipides ne débute qu'après un contact assez prolongé entre l'éther alcoolisé et le sérum. Cette étude leur fit faire d'intéressantes constatations :

Machebœuf et Sandor ont remarqué que l'agitation continue de l'éther et du sérum alcoolisé n'était pas indispensable : en effet, si après avoir agité, on enlève l'éther dès qu'il se sépare par décantation, donc bien avant que ne soit écoulé le temps nécessaire à l'extraction, on voit des gouttelettes graisseuses se rassembler à la surface du liquide. Il ne s'agit donc pas d'un phénomène de partage des lipides entre l'éther et le sérum, mais d'une rupture d'une liaison qui retenait les lipides en phase aqueuse.

Théorie de Machebœuf *et* Sandor.

Les protéides contiennent de nombreuses fonctions chimiques hydrophiles ; ils contiennent en outre des chaînes polyméthyléniques ne présentant aucune affinité spéciale pour l'eau, mais ces chaînes polyméthyléniques doivent, pensa Machebœuf, présenter au contraire une affinité notable pour leurs homologues, les chaînes polyméthyléniques des lipides.

Se basant sur cette remarque et sur les faits expérimentaux précédemment décrits, Machebœuf et Sandor (71) conçoivent un ensemble complexe lipides-protéides, dans lequel ces deux constituants seraient unis par l'affinité réciproque que présentent leurs chaînes polyméthyléniques communes, tandis que les fonctions hydrophiles des protéides seraient orientées vers l'eau.

Autour de cet ensemble complexe se trouverait une zône particulière « d'influence réciproque » eau-fonctions hydrophiles et ce sont les molécules d'eau entourant cet ensemble qui formeraient la zône si difficilement pénétrable à l'éther et en général aux réactifs non hydrophiles des lipides.

Les lipides eux-mêmes seraient du reste orientés de façon à satisfaire l'affinité de leurs fonctions hydrophiles, si bien que l'éther qui parviendrait à atteindre les lipides ne les attaquerait

que par ces fonctions hydrophiles et non par leurs parties éthérosolubles. *(1)*

Cette théorie semble expliquer d'une façon satisfaisante l'action de l'alcool, qui modifierait la zône protectrice en la rendant perméable à l'éther (68).

Les liaisons unissant les lipides aux protéides dans la matière vivante ne sont pas toutes de même nature.

L'éther alcoolisé, en effet, n'enlève pas tous les lipides et Machebœuf et Sandor pensent que leur théorie de fixation des lipides aux protéides par solvatation des chaînes homologues ne s'applique qu'à une partie des lipides du sérum ; d'autres lipides que n'enlève pas l'éther alcoolisé sont liés aux protéides d'une façon plus énergique au sujet de laquelle ils ne pensent pas être autorisés à émettre une hypothèse.

L'hypothèse de la solvatation semblait même à Machebœuf encore très fragile ; il chercha à l'étayer par de nouvelles recherches auxquelles il voulut bien nous associer et l'exposé de nos recherches va faire l'objet principal de la présente thèse.

---

(1) L'hypothèse de Langmuir sur l'orientation des fonctions hydrophiles vers l'eau fut vérifiée directement par une élégante expérience de Devaux (19) : si l'on verse sur de l'eau chaude, certaines substances telles que des cires ou des graisses, ces substances dont la densité est faible flottent sur l'eau et s'y rassemblent en une couche huileuse. Par refroidissement, on obtient une plaque dont une face s'est solidifiée en contact avec l'air, tandis que l'autre face était au contact de l'eau. Les deux faces de la plaque n'ont pas des propriétés semblables : l'une est mouillable par de l'eau et l'autre ne l'est pas. La mouillabilité caractérise la face qui était au contact de l'eau, car cette face est formée par une couche continue de groupements hydrophiles appartenant à des molécules qui avaient été orientées par l'eau.

CHAPITRE II

Étude Expérimentale

Etude Expérimentale

Action des savons sur le sérum sanguin

Les lipides et les protéides sont liés dans le sérum sanguin comme d'ailleurs dans les protoplasmes des cellules vivantes pour former des cénapses aux propriétés très spéciales.

Quelle est la nature des liaisons qui unissent les lipides aux protéides ?

Seules des hypothèses hasardeuses pouvaient être échafaudées pour satisfaire à ce sujet notre désir de comprendre.

Nous avons vu dans le précédent chapitre que MACHEBŒUF et SANDOR (71) avaient proposé une hypothèse rendant compte des propriétés de certaines cénapses du sérum. Cette hypothèse avait été basée sur le fait que l'éther, additionné d'une petite quantité d'alcool, a la propriété d'extraire du sérum une proportion importante des lipides, tandis que l'éther sans alcool n'en extrait pas.

Par une suite de déductions, MACHEBŒUF et SANDOR avaient été amenés à penser que les lipides ainsi extractibles par l'éther faiblement alcoolisé devaient être liés aux protéides par une simple solvatation réciproque des chaines polyméthyléniques semblables que l'on rencontre à la fois dans les lipides et dans les molécules de protéides.

Ces auteurs admettaient par contre que les lipides non extractibles par l'éther alcoolisé devaient être liés plus solidement aux protéides.

Cette hypothèse sur la nature des liaisons peu stables n'était qu'une hypothèse de travail qualifiée de hasardeuse par ses au-

teurs eux-mêmes ; c'est elle cependant qui a suggéré l'idée directrice de notre travail.

Si, en effet, l'union des protéides à certains lipides est simplement réalisée par une solvatation réciproque de chaines polyméthyléniques semblables, on doit pouvoir détacher des lipides ainsi accrochés en faisant arriver au contact des protéides et en quantité suffisante d'autres substances également polyméthyléniques. Il fallait toutefois que ces substances chargées de déplacer les lipides, en quelque sorte par action de masse, fussent hydrosolubles afin que leur contact avec les molécules protéidiques dans le sérum soit intime.

L'idée nous vint naturellement d'utiliser des savons d'acides gras ; ces acides, en effet, sont essentiellement constitués par une longue chaine polyméthylénique.

Divers auteurs avaient déjà étudié certains points particuliers de l'action des savons sur le sérum.

Ostwald (84) le premier avait constaté que lorsqu'on ajoute des savons à des fractions protéidiques sériques, il se forme parfois un précipité. Cet auteur pensa simplement que les protéides avaient la propriété d'enlever au savon tout son alcali et provoquaient ainsi la précipitation des acides gras.

Jarisch (55) reprenant sur le sérum les expériences d'Ostwald avait ajouté de très petites quantités de savon à du sérum ; il avait seulement recherché si ces savons s'unissaient aux protéides ; son travail, fort intéressant d'ailleurs, ne montrait pas un « décollage » quelconque des lipides du sérum sous l'influence des savons ; peut-être avons-nous pensé, Jarisch avait-il opéré en présence de quantités trop faibles de savons ?

Charonnat (9) a tout récemment montré que certaines substances et en particulier des savons pouvaient, en milieu alcalin, permettre à l'éther d'extraire du cholestérol du sérum. Cette observation est très intéressante ; Charonnat (9) cherchait simplement à perfectionner la méthode de dosage du cholestérol dans le sérum selon la technique de Grigaut (33). Dans cette technique le sérum est traité par de l'alcool sodé et de l'éther. Charonnat (10) montra que diverses substances, et en particulier des sels d'acides gras, pouvaient être utilisés à la place de l'alcool sodé, si l'on se plaçait en milieu alcalin.

Notre but était entièrement différent ; nous ne voulions d'ailleurs pas risquer une dénaturation des protéides en alcalinisant le sérum. De plus CHARONNAT faisait agir simultanément savon alcali et éther ; nous voulions étudier un phénomène moins complexe et nous cherchions l'action isolée des savons sur les cénapses lipidoprotéidiques au pH même su sérum, voulant en même temps préciser toutes les modalités de cette action.

Par la suite nous fumes amenés aussi à étudier l'action combinée du savon et de l'éther, puis même l'influence du p H sur les phénomènes constatés. Nos essais, dans le cas particulier où nous avons opéré dans des conditions semblables à celles où s'est placé CHARONNAT, ont entièrement confirmé les résultats de ce savant tout en les élargissant puisque nous n'avons pas étudié que le cholestérol mais l'ensemble des lipides sériques.

Dans une première série d'essais nous avons utilisé une solution d'oléate de sodium concentrée et neutre (contenant 21 p. 100 d'acide oléique et ayant un pH voisin de celui du sang (7,2 à 7,3)) et nous l'avons ajoutée au sérum en quantités variables.

Nous avons préparé cet oléate de sodium par addition de la quantité théorique de soude caustique en solution alcoolique à une quantité déterminée d'acide oléique purifié également en solution dans l'alcool. Mais pour que le p H final soit celui désiré, avant d'ajouter les dernières gouttes de solution de soude, nous avons effectué sur de faibles prises d'essai des mesures colorimétriques de pH (bleu de bromothymol).

Pour éviter l'influence de l'alcool sur le virage de l'indicateur, nous avons chaque fois dilué la prise d'essai dans un peu d'eau avant d'ajouter l'indicateur. Nous avons cessé d'ajouter de la soude, lorsque le pH atteignit la limite recherchée (7,1). L'alcool a alors été chassé par évaporation dans le vide et le résidu de cette évaporation a été dissous dans de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue fut enfin titrée, puis amenée par dilution au titre désiré.

A une série d'échantillons de 20 cm^3 chacun d'un sérum de cheval normal on ajoute, en agitant, des quantités croissantes de la solution de savon. Pour 0,25 cm^3 de la solution d'oléate, il n'apparait aucun précipité, mais si l'on double la quantité de savon ajoutée, un léger louche apparait.

Si l'on augmente encore cette quantité (3,5 cm^3 environ), il se forme un volumineux précipité ; si enfin, fait curieux, le savon est ajouté en notable excès, le précipité n'est plus aussi abondant ; un optimum très net se manifeste donc.

S'agit-il, comme l'avait pensé Ostwald (84), d'un simple précipité d'acides gras libérés du savon par hydrolyse ou s'agit-il, comme le crut Jarisch (55), de complexes protéides-acides gras ?

Aucune de ces hypothèses ne se vérifia. En effet, le précipité recueilli est soluble dans l'éther si bien que, si l'on agite le sérum traité par le savon avec de l'éther, on constate que ce solvant dissout le précipité.

Le précipité est donc rigoureusement soluble dans l'éther et ne contient pas de protéides ; de plus, il est riche en cholestérol et en phosphatides qui ne proviennent évidemment pas de notre solution de savon que nous avions préparée avec un acide bien purifié : cholestérol et phosphatides ne pouvaient provenir que du sérum, d'où le savon les avait précipités en les arrachant aux substances qui les maintenaient en solution (protéides vraisemblablement). Le précipité contenait d'ailleurs d'autres lipides. Nous avons pu vérifier aussi que le précipité contenait toujours un peu de l'acide gras correspondant au savon utilisé. Nous avons pu le démontrer en reprenant cette série d'expériences avec le dibromostéarate de potassium et en mettant en évidence la présence de brome dans l'extrait éthéré (18).

Puisqu'une certaine proportion de l'acide gras était ainsi précipitée, on pouvait penser que le savon était simplement hydrolysé par dilution dans le sérum avec libération d'acides gras insolubles qui, par simple coefficient de partage, enlèverait à la phase sérum une partie de ses lipides.

Pour éviter une telle hydrolyse du savon, nous avons répété l'expérience en portant au préalable le sérum et la solution de savon à pH 8,8. Lorsqu'on mélange ces deux solutions franchement alcalines, il apparait également un abondant précipité. On ne peut pas admettre qu'à ce pH, il y ait hydrolyse du savon précipitant l'acide gras ; d'ailleurs, si l'on dilue la solution de savon avec de l'eau distillée au lieu de sérum, il n'apparait aucun précipité même si le pH est notablement inférieur à 8,8.

Afin de pouvoir saisir l'importance de la fraction lipidique

que pouvait extraire l'éther en présence de savon, nous avons effectué l'expérience suivante : dans deux ampoules à décantation identiques, nous avons placé 20 cm³ d'un sérum de cheval frais ; dans l'une seulement de ces ampoules nous avons ajouté trois centimètres cubes d'oléate de sodium en solution aqueuse à 21 p. 100, l'autre échantillon servant de témoin. Nous avons agité, puis, dans chaque ampoule, nous avons mis 20 cm³ d'éther. Enfin, nous avons fait subir à chaque ampoule une nouvelle agitation. Après 24 heures de contact, chaque phase éthérée fut séparée, lavée par agitation avec de l'eau distillée puis divisée en deux parts placées dans deux fioles de FOURNEAU, l'une devant servir à un dosage de cholestérol libre, *(1)* l'autre à un dosage du phosphore. *(2)*

On constate alors que l'éther agité avec le sérum sans savon n'extrait seulement que 0,35 mg de cholestérol libre et pas de phosphore tandis que si le sérum a été préalablement traité par le savon, l'éther extrait 7 mg de cholestérol libre et 0,18 mg de phosphore (soit 4,71 mg de phosphatides) et en outre une assez grande quantité d'esters du cholestérol.

Dans une seconde série d'expériences nous avons repris un essai analogue sur un sérum de cheval normal dans lequel nous avions préalablement déterminé le cholestérol total, le cholestérol libre, le cholestérol estérifié et le phosphore lipidique, nous n'avons plus opéré ici avec une solution d'oléate de sodium mais avec une solution de linoléate de sodium à pH 7,2.

Le sérum sur lequel nous avons opéré dans cet essai contenait pour 20 cm³.

Cholestérol total	17,20 mg
Cholestérol libre	1,08 mg
Cholestérol estérifié	16,12 mg
Phosphore lipidique	1,10 mg

(1) Le cholestérol libre a été dosé sur le résidu obtenu par évaporation de l'éther, au moyen de la méthode de WINDAUSS-CAMINADE (116-8) - (Pesée du complexe cholestérol-digitonoside).

(2) Le phosphore a été dosé après destruction sulfonitrique des matières organiques par la méthode de M. MACHEBŒUF (67).

Si 20 cm^3 de ce sérum sont additionnés de 3,5 cm^3 de solution neutre de linoléate de sodium, contenant 0,13 gr. d'acide linoléique par cm^3, il se forme un volumineux précipité que l'on peut recueillir en l'agitant avec de l'éther.

On constate alors qu'après cinq jours de contact l'éther, recueilli comme dans l'expérience précédente, contient :

Cholestérol total	15,22 mg
Cholestérol libre	1,07 mg
Cholestérol estérifié	14,15 mg
Phosphore lipidique	0,86 mg

Conclusions des essais préliminaires

Ces deux séries d'essais préliminaires nous montrent que les savons et en particulier l'oléate et le linoléate de sodium ont la propriété de décoller du sérum des lipides et du cholestérol en abondance.

Tout le cholestérol libre, environ les huit dixièmes du cholestérol total et les six dixièmes du phosphore lipidique peuvent ainsi être extraits du sérum par le linoléate de sodium.

Notons que dans cet essai et dans la plupart de ceux qui vont suivre, nous avons étudié l'action combinée du savon et de l'éther, mais on sait qu'en l'absence de savon, l'éther n'extrait au sérum que d'infimes traces de lipides, or il est très difficile de recueillir quantitativement le précipité formé par addition de savon au sérum, car ce précipité a une densité trop peu différente de celle du sérum et il se recueille très mal par centrifugation ; d'autre part il traverse les filtres à gros pores et colmate les filtres serrés.

Suite des essais préliminaires : Etude des cénapses formés par l'union de l'acide gras avec les protéides

Si, comme nous le pensions, les savons expulsent les lipides des complexes lipidoprotéidiques du sérum sanguin pour se fixer aux chaines polyméthyléniques des protéides, il doit se former des cénapses protéides-savon que nous nous sommes efforcé de mettre en évidence. Pour cela, dans un premier essai, nous avons traité 20 cm^3 de sérum de cheval par 2 cm^3 de solution d'oléate de sodium (contenant 21 p. 100 d'acide oléique), puis nous avons extrait par de l'éther le précipité formé ; dans le liquide aqueux ainsi obtenu, l'acide oléique pouvait se trouver simplement à l'état de savon non lié aux protéides ; il pouvait au contraire, comme nous le pensions, être en partie lié aux protéides dont il avait détaché les lipides qu'a enlevés l'éther.

Si de l'acide oléique est lié aux protéides, les propriétés de solubilité de ces protéides doivent être modifiées ; nous avons donc cherché tout d'abord si une variation convenable de pH était susceptible de faire apparaitre un précipité protéidique qu'une variation égale de pH ne ferait pas apparaitre dans un sérum non traité par le savon.

Cette première tentative fut couronnée de succès : dès que l'on acidifie le liquide vers pH 4,6, il apparait un abondant précipité blanc, tandis que pour un sérum non traité par le savon rien de comparable ne se produit.

Ce précipité pouvait être, il est vrai, formé tout simplement par de l'acide oléique libéré du savon par acidification ; dans ce cas, il n'aurait pas contenu de protéides. Nous l'avons recueilli par centrifugation et dès lors nous avons constaté qu'il était plus dense que l'eau, or un acide gras libre ne se serait

pas comporté ainsi. Bien plus, ce précipité est riche en protéides et si on le lave soigneusement à l'aide d'eau, il reste riche en protéides.

Plus encore, si l'on met ce précipité dans de l'eau en présence de la très petite quantité d'alcali nécessaire pour neutraliser le mélange, on voit le précipité se gonfler rapidement en donnant une masse gélatineuse fluide (gliode), puis se dissoudre.

La solution obtenue est limpide, elle contient en abondance des protéides *(1)* et aussi des acides gras.

Ces protéides n'ont pu être entrainés jusqu'à ce stade final et subir la précipitation à pH 4,6 puis les lavages que s'ils étaient liés à quelque substance modifiant foncièrement leur solubilité.

La seule substance qui se trouvait dans cet essai et qui ne se trouvait pas dans l'essai témoin est l'oléate ; il faut donc penser que c'est bien la liaison avec l'oléate qui a conféré aux protéides ces propriétés nouvelles.

Dans un deuxième essai, nous avons non seulement cherché à éliminer par de l'éther les lipides précipités par le savon, mais aussi, secondairement, le savon qui pouvait être en excès, avant de chercher à précipiter les cénapses protéides-savons.

Pour cela, après avoir traité comme ci-dessus le sérum à pH 7,3 par le savon et l'éther, nous avons acidifié à pH 6 et agité à nouveau avec de l'éther. A ce pH, le savon libre de toute attache protéidique devrait être quantitativement décomposé par hydrolyse avec passage de l'acide gras dans l'éther ; s'il reste de l'acide gras dans la phase aqueuse, c'est qu'une liaison quelconque l'y retient.

Nous avons donc pris 10 cm³ de sérum de cheval préalablement traité par de l'éther en présence de 2 cm³ de la solution d'oléate de sodium (à 21 p. 100 en acide oléique) et nous y avons ajouté goutte à goutte de l'acide sulfurique normal jusqu'à ce que le pH soit de 6. Il apparait alors un gros précipité blanc. On agite énergiquement avec 25 cm³ d'éther jusqu'à émulsion.

(1) Décelés par la réaction de Millon effectuée sur une goute du liquide.

Après centrifugation l'ensemble se divise en 3 phases :

a) phase inférieure aqueuse limpide ;
b) phase moyenne (précipité ou émulsion) ;
c) phase supérieure éthérée limpide.

La phase éthérée est recueillie, lavée à l'eau distillée et évaporée ; le résidu desséché sous vide en présence d'anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant, pèse 62 mg.

Une partie seulement de l'acide oléique est donc extraite à pH 6 (62 mg sur 130 environ).

Ceci permet déjà de conclure que les protéides même à un pH inférieur à 7 retiennent de l'acide oléique masqué ainsi à l'éther.

La phase aqueuse limpide est alors traitée par de l'acide sulfurique très dilué qui provoque l'apparition d'un précipité blanc (pH 5) qui, recueilli puis mis en contact avec de l'eau légèrement alcalinisée, forme une gelée transparente et molle, puis se dissout. Si une nouvelle fois on ramène le pH aux environs de 5 à l'aide d'acide sulfurique dilué, le liquide devient laiteux, mais il ne se rassemble pas de précipité (même si le pH est 3,9).

Dans ce liquide, on ajoute goutte à goutte une solution de sulfate d'ammonium, il se forme un précipité dense que l'on peut recueillir par centrifugation.

On le dissout dans une solution alcaline, puis on le précipite de nouveau par addition d'acide. Notons qu'après centrifugation les eaux mères contiennent 232 mg de protéides et 8,5 mg de substances lipoïdiques. Le précipité est divisé en deux parts égales : sur l'une de ces part on caractérise la présence de protéides par la réaction de Millon, sur l'autre on effectue un dosage de substances lipoïdiques et de protéides par la méthode de Kumagawa et Suto (59).

Ce dosage montre que le précipité contient 30,7 mg de protéides et 7,6 mg de substances lipoïdiques. Ces substances lipoïdiques sont constituées en majeure partie par des acides gras à l'état de savon, car si l'on évapore à sec leur solution alcoolique, on constate que 2,6 mg seulement du résidu se dissolvent dans

l'éther ; 5,5 mg ne peuvent se dissoudre dans ce solvant qu'après acidification, ils sont donc bien constitués par un savon insoluble dans l'éther mais dont l'acidification libère l'acide gras soluble dans l'éther. Nous avons vérifié que l'acide gras est bien de l'acide oléique.

Ceci montre explicitement qu'il s'est fait des cénapses protéides-acide oléique, lorsque l'acide gras a chassé les lipides des cénapses du sérum.

Ces cénapses ainsi formées ne livrent pas leur acide gras à l'éther même à pH 5. Cet essai nous permet de constater que le rapport Acide gras/Protéides totaux dans les cénapses ainsi formées est de 7,6/30,7. Ces cénapses contiennent donc 25 p. 100 d'acide gras, ce qui correspondrait à une soixantaine de molécules d'acide gras fixées par molécule de protéides s'il s'agit d'albumines et à 120 s'il s'agit de globulines.

Pour vérifier que dans ces cénapses les lipides fixés aux protéides sont bien constitués par de l'acide oléique, nous avons cherché à mettre la liaison éthénique en évidence à l'aide de brome.

Pour cela, nous avons dissous dans le chloroforme l'acide gras isolé du savon de ces cénapses et nous avons ajouté à la solution ainsi obtenue une solution chloroformique de brome jusqu'à coloration persistante. Nous avons alors constaté qu'il fallait ajouter une quantité de brome de même ordre de grandeur que celle nécessaire pour obtenir la coloration d'un même poids d'acide oléique pur traité dans les mêmes conditions.

Il s'est donc bien formé des cénapses par union d'acide oléique aux protéides.

Afin de pouvoir confirmer avec plus de certitude encore ces essais et pour bien montrer que c'est l'acide du savon qui se fixe aux protéides, nous avons utilisé un savon dont l'acide gras n'existe pas dans le sérum. Nous avons choisi l'acide dibromo-9-10 stéarique que nous avons préparé par addition d'une molécule de brome à une molécule d'acide oléique. Cet acide bromé donne un savon très soluble à pH 7,1 et la réaction du brome décrite par Denigès et Chelle (18) nous permet après carbonisation alcaline de déceler la présence de cet élément dans les diverses phases étudiées.

Un essai identique à celui décrit précédemment a donc été effectué avec le dibromostéarate de potassium. Nous avons pu montrer ainsi l'existence de cénapses protéides-acide dibromostéarique par caractérisation du brome dans les précipités protéidiques après action du savon et de l'éther et même après lavage à l'éther des phases aqueuses acidifiées à pH 6,3.

Conclusions générales du chapitre II

Les savons arrachent des liquides aux cénapses lipidoprotéidiques du sérum et en ce faisant les savons s'unissent aux protéides en prenant en quelque sorte la place des lipides pour former des cénapses nouvelles protéides-acides gras. Ces cénapses protéides-acides gras sont relativement stables puisque, même si l'on acidifie le liquide jusqu'à pH 6,5, l'agitation avec de l'éther ne leur enlève pas d'acide gras.

Les propriétés de solubilité de ces cénapses sont très différentes de celles des protéides qui les forment, car l'acidification à pH 5 les insolubilise. Si l'on neutralise secondairement le liquide, les cénapses acides gras-protéides se remettent en solution.

Ces faits sont en parfait accord avec l'hypothèse émise autrefois par Machebœuf et Sandor (71) et qui fut à l'origine de l'idée directrice de ces recherches, car tout se passe comme si les lipides de certaines cénapses du sérum étaient bien liés aux protéides par simple solvatation réciproque de chaines polyméthyléniques.

En effet, l'addition au sérum d'un excès de substances hydrosolubles également polyméthyléniques, telles que des savons, détache des lipides, le savon prenant leur place pour former des cénapses protéides-savon.

Afin de pouvoir étayer mieux encore l'hypothèse qui nous guide, nous avons cherché à préciser les modalités de l'action des savons, nous avons donc étudié l'influence des divers facteurs sur la réaction entre savons et sérum. C'est l'exposé des résultats de ces recherches qui va faire l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

Étude de l'influence des divers facteurs sur l'extraction des lipides du sérum par l'éther en présence de savons

Etude de l'influence des divers facteurs sur l'extraction des lipides du sérum par l'éther en présence de savons

Influence de la quantité de savon ajoutée au sérum

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que si l'on ajoute au sérum une très petite quantité de savon, aucun précipité n'apparait, mais si l'on augmente progressivement la teneur en savon, il arrive un moment où l'on obtient un fort précipité ; enfin, si le savon ajouté est en excès, le précipité semble moins abondant que dans le cas précédent.

Il nous a paru intéressant d'étudier ce phénomène quantitativement. Nous avons utilisé pour cela une solution de dibromostéarate de potassium contenant 193,2 gr. d'acide dibromostéarique par litre et ajustée à pH 7,1. Cette solution est donc N/2,28 en acide dibromostéarique.

Technique. On place dans six ampoules à décantation identiques.

	importance du précipité
ampoule N° 1 : 20 Cc de sérum + 0,5 Cc de sol. de savon	0
ampoule N° 2 : 20 Cc de sérum + 1 Cc de sol. de savon	+
ampoule N° 3 : 20 Cc de sérum + 2 Cc de sol. de savon	++
ampoule N° 4 : 20 Cc de sérum + 4 Cc de sol. de savon	+++++
ampoule N° 5 : 20 Cc de sérum + 8 Cc de sol. de savon	+++
ampoule N° 6 : 20 Cc de sérum + 12 Cc de sol. de savon	++

Toutes les ampoules sont agitées de la même façon. On place alors dans chacune 20 cm³ d'éther puis on agite avec précaution, et après six jours de contact on sépare les phases éthérées. *(1)*

Celles-ci sont alors lavées à l'eau distillée, afin d'en enlever les substances non lipidiques qui auraient pu être entrainées mécaniquement. Chaque solution éthérée ainsi lavée est placée dans une fiole de FOURNEAU tarée ; on chasse l'éther par évaporation, puis on dessèche le résidu dans le vide en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant.

Extrait éthéré total.

Les résultats obtenus lors de la pesée montrent que l'extrait éthéré total varie avec la teneur en savon. Il existe une concentration optimale en savon, pour laquelle l'extrait éthéré total est maximum.

Dans le tableau n° 1 sont rassemblés les chiffres rapportés à 100 cm³ de sérum en présence de quantités variables de dibromostéarate de potassium. La courbe de la figure n° 1 schématise ces résultats : en abcisses sont portés les volumes en (cm³) de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 ajoutés à 100 cm³ de sérum ; en ordonnées sont indiqués les poids (en mg) de substances extraites par l'éther.

Il existe pour le sérum de cheval qui nous a servi ici un optimum très net correspondant à 20 cm³ de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 pour 100 cm3 de sérum (soit 3,87 gr. d'acide dibromostéarique).

Notons tout d'abord que la teneur du sérum en lipides totaux était de l'ordre de 8 grammes par litre de sérum, soit 0,8 grammes dans 100 cm³ ; pour que le décollage des lipides soit optimum, il faut donc que le savon soit en quantité notablement supérieure à celle des lipides qui sont « décollés ». On conçoit bien que si le savon déplace par action de masse les lipides dont il prend la place, il faille un excès de savon ; mais

(1) Cette séparation a pu généralement être effectuée d'une façon quantitative. C'est seulement lorsque la concentration en savon devenait très importante que la formation d'émulsions a géné légèrement cette séparation.

TABLEAU I.

Poids en grammes d'acide dibromostéarique ajouté à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Volumes en cm3 de la solution de dibromostéarate de K N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	Extrait éthéré total (mg)
0,484	2,5	49
0,969	5	137
1,938	10	680
3,876	20	748
7,752	40	635
11,620	60	584

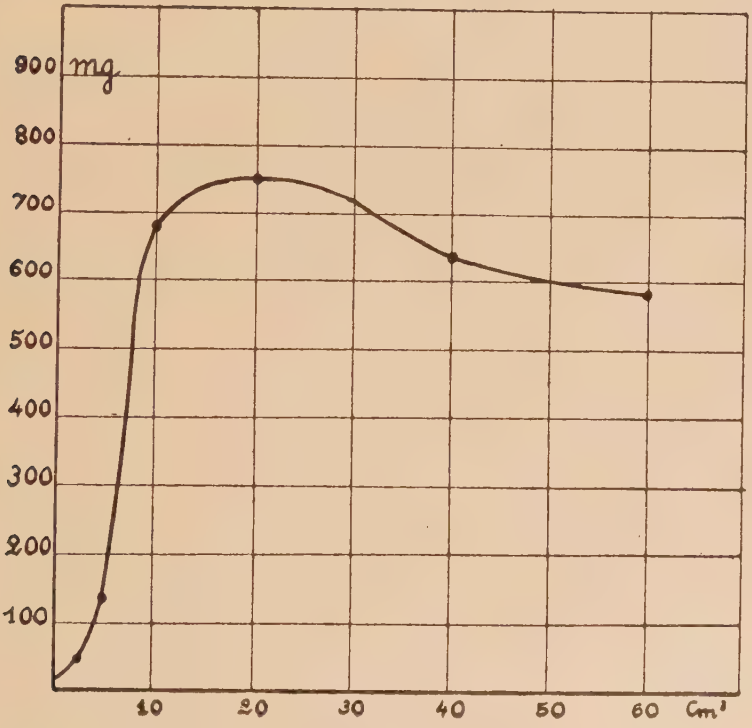


FIGURE 1

Courbe représentative des variations de la quantité d'extrait éthéré total en fonction de la quantité de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

ce qui semble à première vue plus surprenant, c'est l'existence d'un optimum, car on pourrait s'attendre à voir la réaction évoluer d'autant mieux que l'excès de savon serait plus grand. Une courbe assymptotique par exemple aurait été moins surprenante.

Comment donc interpréter ce fait ? On sait que les savons ont la propriété de solubiliser les lipides dans l'eau lorsque la quantité de savon ajoutée aux lipides est suffisante ; on doit donc admettre que lorsque, dans le mélange sérum-savon, il y a un fort excès de savon, les lipides décollés des protéides sont solubilisés dans l'eau par cet excès de savon et ne passent plus dans l'éther. Nous devons donc subdiviser la courbe de la figure 1 en deux zônes au moins : dans une première zône, inférieure à l'optimum, le savon ajouté sans excès « décolle » les lipides et s'accole à leur place aux protéides. Dans la zône supra-optimale par contre, tous les lipides sont décollés et l'excès de savon ne trouvant plus de protéides auxquels se lier, s'unit aux lipides pour former des complexes hydrophiles ; il s'établit ainsi un partage des lipides entre la phase éthérée et la phase aqueuse savonneuse.

Notons cependant encore que l'extrait éthéré, dont nous étudions ici les variations, n'est pas constitué seulement par des lipides arrachés au sérum, il contient aussi en abondance de l'acide gras provenant du savon qui s'hydrolyse en partie.

Le phénomène, dont les variations sont représentées par la courbe, est donc complexe et nous ne mesurons que la résultante de plusieurs phénomènes simultanées :

a) Arrachement des divers lipides.

b) Hydrolyse partielle du savon et passage dans l'éther de l'acide gras libéré par cette hydrolyse.

c) Dissolution partielle dans l'eau des lipides et de l'acide gras libéré par le savon en excès.

d) Partage entre l'éther et la phase aqueuse savonneuse et protéidique des lipides et de l'acide gras libéré par hydrolyse.

Pour pouvoir dissocier ces phénomènes intriqués, nous avons étudié séparément le passage dans la phase éthérée de diverses

substances lipoïdiques du sérum, pour lesquelles une méthode analytique précise nous permettait d'effectuer des dosages.

Nous avons ainsi étudié le passage dans l'éther des phosphatides du sérum grâce à la méthode de microdosage titrimétrique si précise du phosphore de MACHEBŒUF. *(1)*

Nous avons également étudié le passage dans l'éther du cholestérol grâce à la réaction colorée si sensible de LIEBERMANN *(2)* qui nous a permis des dosages colorimétriques au moyen d'un colorimètre de DUBOS après saponification libérant le cholestérol de ses esters. *(3)*

Pour le *cholestérol*, nous avons aussi, pour préciser certains détails, opéré parfois par la méthode pondérale de WINDAUSS modifiée par CAMINADE. *(4)* Cette technique a l'avantage d'être très rigoureuse et surtout de permettre la différenciation entre le cholestérol lui-même d'une part et ses esters d'autre part.

Notons cependant que l'extrait éthéré contient à l'optimum tous les glycérides du sérum.

(1) La méthode de microdosage du phosphore de MACHEBŒUF (67) est basée sur le principe suivant : après destruction sulfonitrique des matières organiques, on précipite le phosphore sous forme de sulfo-phospho-molybdate d'ammonium dans des conditions bien déterminées. Après lavage du précipité ainsi obtenu, on détermine par titrimétrie sa teneur en azote, qui permet de calculer la quantité de phosphore.

(2) La réaction de LIEBERMANN (64) consiste à comparer avec un témoin l'intensité de la coloration verte obtenue par addition à l'insaponifiable de chloroforme, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique.

(3) Pour effectuer cette saponification, on prélève une partie aliquote de l'extrait éthéré total, puis après l'avoir additionnée de potasse alcoolique, on la porte pendant une heure au microréfrigérant ascendant. La solution alcoolique alcaline est alors additionnée d'éther de pétrole qui est soluble dans l'alcool. On obtient ainsi une phase unique alcoolopétrolique limpide. On ajoute un volume d'eau égal à la moitié du volume de l'alcool présent dans le mélange. Il se sépare alors deux phases distinctes : l'une alcoolo-aqueuse qui contient les savons, l'autre éthéro-pétrolique qui contient le cholestérol et les autres substances insaponifiables. Les deux phases sont séparées par décantation ; la phase pétrolique, lavée par agitation avec un peu d'alcool à 50°, est enfin évaporée. C'est sur le résidu de cette évaporation, qui constitue l'insaponifiable total, que l'on effectue la réaction du cholestérol.

(4) Le dosage du cholestérol par la méthode de WINDAUSS (16) consiste à peser le complexe cholestérol-digitonoside formé par addition aux lipides d'une solution de digitonoside dans le solvant de CAMINADE (8) constitué par un mélange d'acétone, d'alcool et d'eau. On obtient ainsi la teneur en cholestérol non estérifié (cholestérol libre). Pour obtenir le cholestérol total, on opère la précipitation par le digitonoside sur l'insaponifiable séparé, après saponification des lipides par de la potasse alcoolique.

Pour étudier les modalités du passage de ces glycérides dans l'éther, il eut fallu les déterminer par différence en déduisant la quantité de glycérol correspondant aux phosphatides de la quantité totale de glycérol, obtenue par saponification de nos extraits éthérés.

Les méthodes de dosage du glycérol, permettant d'opérer sur des quantités aussi petites de glycérol que celles que nous pouvions trouver dans les conditions où nous devions nous placer, sont des techniques dont la précision n'est jamais grande.

La détermination par différence du glycérol des glycérides aurait été entachée d'erreurs relatives considérables. Aussi, avons nous porté notre intérêt sur les lipides pour lesquels des méthodes de microdosage précises pouvaient être mises en jeu ; phosphatides, stérides et stérols.

Notons également que l'extrait éthéré total contient, pour des concentrations en savon voisines de la concentration optimale, certains pigments du groupe des carotènes (lipochrome), que nous avons pu caractériser par la réaction colorée qu'ils donnent avec le trichlorure d'antimoine.

Etude de l'extraction des Phosphatides

Pour suivre l'extraction des phosphatides, nous avons prélevé une portion aliquote de chaque extrait éthéré et nous y avons dosé le phosphore après destruction de la matière organique.

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau N° 2 où ils sont exprimés en mg de phosphore extrait par l'éther de 100 cm^3 de sérum. Ces chiffres nous ont permis de tracer la courbe N° 2 représentative des variations de la quantité de phosphatides extraits par l'éther en fonction de la quantité de dibromostéarate de potassium en solution N 2,28 ajoutée au sérum.

Il existe donc pour les phosphatides comme pour l'extrait éthéré total un optimum et la position de cet optimum est la même que pour l'extrait éthéré total (20 cm^3 de dibromostéarate de potassium pour 100 cm^3 de sérum). Bien plus l'optimum est beaucoup plus net lorsque l'on étudie les phospha-

tides seuls que lorsque l'on se contente de peser l'extrait éthéré total qui, en outre des lipides extraits au sérum, contient de

TABLEAU II.

Poids en grammes d'acide dibromostéarique ajouté à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Volumes en cm3 de la solution de dibromostéarate de K N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	Phosphore lipidique (mg)
0,484	2,5	0
0,969	5	0,15
1,938	10	0,85
3,876	20	1,00
7,752	40	0,30
11,620	60	0,25

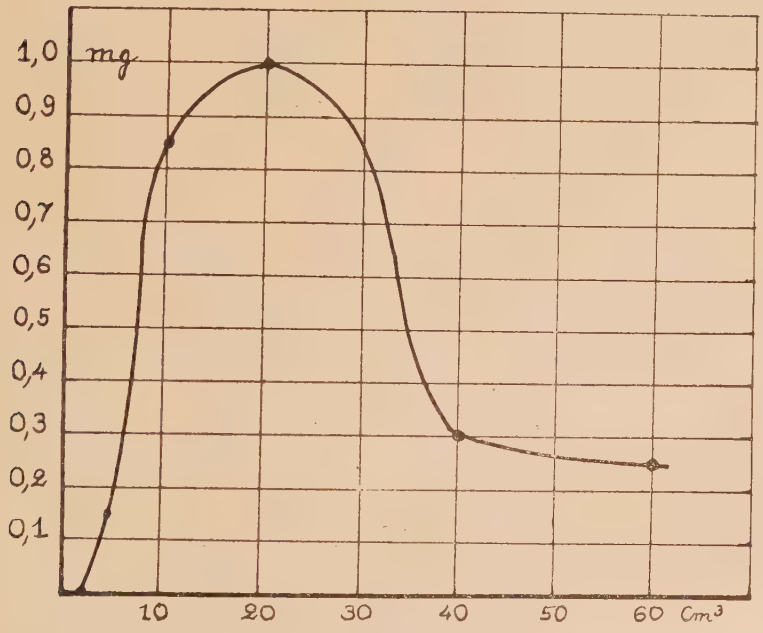


FIGURE 2

Courbe représentative des variations de la quantité de phosphore lipidique en fonction de la quantité de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

l'acide gras du savon. Lorsqu'il y a un trop grand excès de savon la quantité de phosphatides extraite par l'éther s'abaisse considérablement.

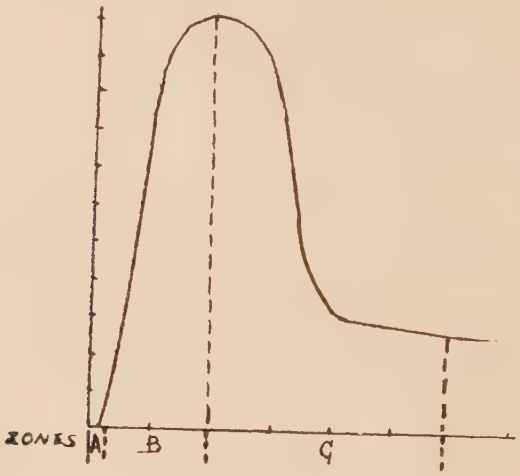


FIGURE 3

Dans une première zône A (fig. 3) l'addition de très petites quantités de savon ne provoque pas le passage dans l'éther de phosphatides ; on peut penser que le savon trouve alors des protéides libres de lipides mais capables de se combiner à lui.

Dans la deuxième zône au contraire le savon, ne trouvant plus de protéides libres, doit pour s'unir à des protéides prendre la place des lipides et en particulier de phosphatides qu'il libère (zône B). Dans une troisième zône enfin (zône C), le savon se trouve en excès par rapport aux protéides et aux lipides qui leur étaient liés, cet excès de savon reste donc libre dans la solution et il s'unit aux lipides libérés pour former des complexes hydrophiles qui ont d'autant moins tendance à passer dans l'éther que l'excès de savon dans la phase aqueuse est plus grand.

Etude de l'extraction du Cholestérol

Afin de suivre également l'extraction du cholestérol en fonction de la quantité de savon ajoutée au sérum, nous avons prélevé une portion aliquote de chaque extrait éthéré et nous y avons dosé le cholestérol total grâce à la réaction colorée de LIEBERMANN (64). Les résultats obtenus dans cet essai sont rassemblés dans le tableau N° 3 ; ils sont exprimés en milligrammes de cholestérol extrait par l'éther de 100 cm³ de sérum.

A ces résultats correspond la courbe de la figure N° 4 représentant les variations de la quantité de cholestérol total extrait par l'éther en fonction de la quantité de solution N/2,28 de dibromostéarate de potassium ajoutée à 100 cm³ de sérum.

TABLEAU III.

Poids en grammes d'acide dibromostéarique ajouté à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Volumes en cm3 de la solution de dibromostéarate de K N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	Cholestérol total (mg)
0,484	2,5	1,9
0,969	5	4,4
1,938	10	46
3,876	20	68
7,752	40	21
11,620	60	15,4

La courbe de la figure N° 4 ressemble beaucoup à celle de la figure N° 2 excepté dans la partie correspondant à l'addition au sérum d'une faible quantité de savon (zône A). On sait en effet que l'éther seul, sans savon, est capable d'enlever au sérum de petites quantités de cholestérol, ce qui explique que la zône A ne correspond plus sur la courbe à une partie confondue avec l'axe des abcisses.

Conclusions

Pour le cholestérol comme pour les phosphatides on constate un optimum d'action du savon et cet optimum est le même

dans les deux cas. Ceci prouve que l'action du savon n'est pas spécifique d'une substance lipoïdique ou d'une autre, et l'on doit admettre que cette action porte sur une propriété des protéides et non des lipides qui leur sont liés. Ceci concorde très bien avec la théorie de solvatation : le savon agit sur les chaînes polyméthyléniques des protéides et s'y accole en déplaçant ce qui s'y trouvait accolé. L'optimum pour chaque lipide correspond à la quantité de savon qui peut se fixer sur les protéides et non à la quantité du lipide considéré qui y était préalablement fixé.

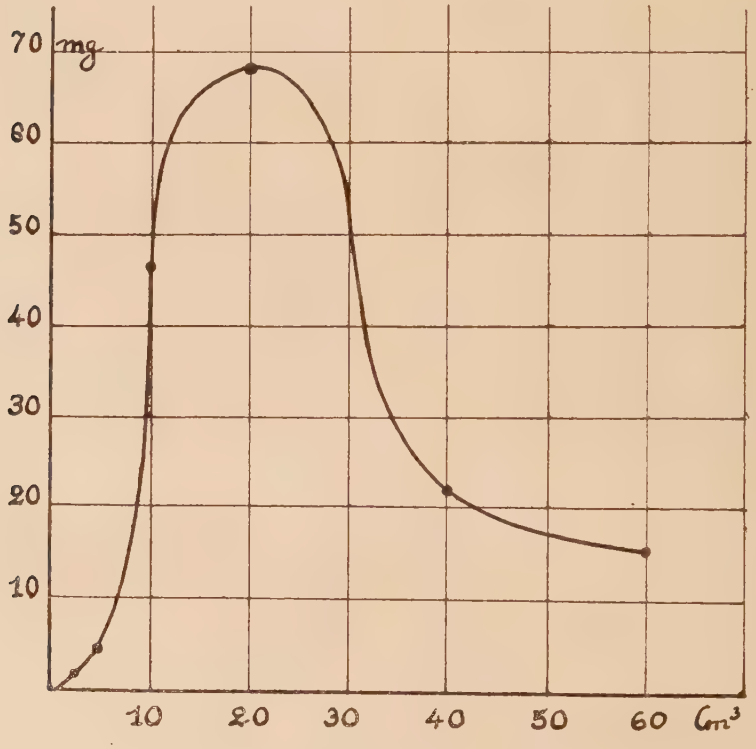


FIGURE 4

Courbe représentative des variations de la quantité de cholestérol total en fonction de la quantité de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

Influence du pH sur l'extraction par l'éther des lipides en présence de savon

CHARONNAT (9-10) a constaté que l'action simultanée de l'éther et des savons sur le sérum en présence d'une certaine quantité d'alcali provoque la libération totale du cholestérol sérique.

Dans les précédents essais, nous avons vu que, si l'on opère en milieu neutre, l'extraction n'est pas totale.

Ces deux résultats différents nous incitèrent à étudier les modalités de l'action du pH sur le phénomène. Pour cela, nous avons utilisé deux solutions de ricinoléate de sodium : la première contenait 148,4 gr d'acide ricinoléique par litre et son pH était 7. L'autre solution fut ajustée à pH 8,6, elle contenait alors 109,3 gr d'acide ricinoléique par litre. Nous avons naturellement mis dans chaque cas des volumes calculés de chacune des solutions pour que les quantités de ricinoléate soient identiques.

Nous avons effectué parallèlement deux essais en ajoutant au sérum des quantités croissantes de savon, l'un avec la première solution, l'autre avec la seconde.

Nous avons opéré comme pour l'essai effectué avec le dibromostérate de potassium. Dans l'extrait éthéré nous avons dosé le phosphore lipidique par la méthode de MACHEBŒUF (67) et le cholestérol total, après saponification, à l'aide de la méthode colorimétrique basée sur la réaction de LIEBERMANN (64). Les résultats que nous avons obtenus avec les deux solutions sont indiqués dans le tableau N° 4.

Nous avons à dessein tracé les courbes de ces deux essais sur un même schéma qui permet ainsi leur comparaison.

TABLEAU IV.

pH de la solution de savon	Poids en grammes d'acide ricinoléique ajouté à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Volume en cm3 de solution de ricinoléate de Na N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
pH : 7	0,37	2,82	traces	2,8
	1,48	11,3	1,62	74
	2,96	22,6	0,57	75
	4,44	33,9	0,57	67
	7,40	56,4	0,54	54
pH : 8,6	0,273	2,1	traces	traces
	1,093	8,4	0,54	57
	2,186	16,8	0,45	57
	4,372	33,6	0,23	57
	6,558	50,4	0,24	56,5

Nous ne donnons pas dans ce tableau les poids d'extrait éthéré total obtenus dans ces essais ; nous nous sommes en effet surtout attaché à étudier le passage dans l'éther des substances lipoïdiques du sérum et en particulier du cholestérol et des phosphatides. L'extrait éthéré total contient en outre des acides gras du savon en quantité naturellement différente suivant le pH. En effet, si la solution est alcaline, le savon étant moins hydrolysé, il passe dans l'éther toujours moins d'acides gras que lorsque le liquide est neutre ; voici cependant deux chiffres précisant l'ampleur de cette différence :

Pour une quantité de savon correspondant à 33,6 cm³ de solution de savon N/2,28 et pour 100 cm³ de sérum, l'extrait éthéré total pesait 942 mg, tandis qu'il pesait 224 mg à pH 8,6. La différence est évidemment considérable mais, malgré cette si grande différence dans le passage de l'acide gras du savon

dans l'éther, le passage dans ce solvant des lipides du sérum est seulement légèrement influencé par une telle variation de pH.

Le passage du cholestérol et des phosphatides dans l'éther n'est donc pas un simple entrainement par l'acide gras du savon qui passe de l'eau dans l'éther.

Les courbes représentatives des variations de l'extrait éthéré total d'une part et celles représentatives de l'extraction de divers lipides sériques d'autre part ne sont pas du tout parallèles ni semblables.

Phosphore lipidique

Les courbes représentatives des variations du phosphore lipidique en fonction de la quantité de savon ajoutée au sérum varient avec le pH. Leur allure générale est cependant invariable, il existe toujours un optimum très net et cet optimum correspond dans chaque cas à une même concentration en savon, mais la quantité de phosphatides extraits à l'optimum varie notablement avec le pH. Il s'extrait beaucoup plus de phosphatides lorsque le pH est 7 que lorsqu'il est plus élevé.

Comment expliquer ce fait ? On peut penser que lorsque l'acide gras du savon arrache les phosphatides aux protéides, non seulement de l'acide gras s'accole à leur place aux protéides mais une autre quantité de l'acide gras s'accole aux phosphatides pour former des complexes. Ce serait à l'état de complexes phosphatides-acide gras que les phosphatides se trouveraient ainsi libérés. Mais ces complexes phosphatides-acide gras sont notablement hydrophiles et se dissolvent dans l'eau d'autant mieux que le pH est plus élevé, si bien que leur passage dans l'éther, qui est régi en quelque sorte par un cœfficient de partage dépendant du pH, est beaucoup moins complet lorsque le pH est élevé.

Cette liaison des lipides avec l'acide gras du savon est fort probable ; on sait en effet que les lipides, et tout particulièrement les phosphatides, se dissolvent dans l'eau en présence de savons et l'on sait aussi que ces solutions ont une solubilité très variable suivant le pH. On ne connait pas la nature

des liaisons qui unissent savons et lipides, mais il est fort probable que l'accolement des molécules se fait grâce aux chaines polyméthyléniques semblables qui se trouvent dans les savons comme dans les lipides.

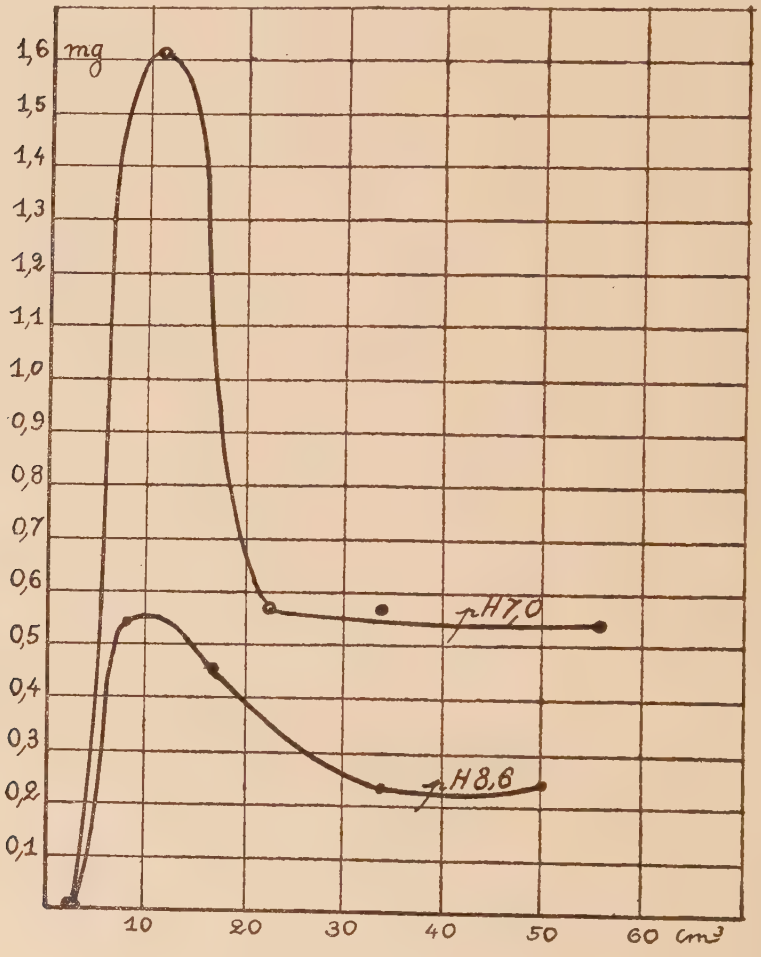


FIGURE 5

Courbes représentatives des variations de la quantité du phosphore lipidique en fonction de la quantité de solution de ricinoléate de sodium N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

Cette hypothèse de l'accolement des acides gras aux lipides explique parfaitement les modalités du passage des lipides et des acides gras dans l'éther en fonction du pH et aussi en fonction de la concentration en savon dans la phase aqueuse. Notons que, dans les expériences rapportées dans ce chapitre, le sérum n'a pas été préalablement alcalinisé lorsque l'on a étudié l'action du savon à pH 8,6.

Seule la solution du savon avait été portée à ce pH, donc le pH du mélange était voisin de 7 lorsqu'il y avait peu de savon, tandis qu'il s'élevait, lorsque la quantité de savon ajoutée était plus importante.

On comprend ainsi que les parties originelles des courbes soient très voisines puisque, la quantité de savon ajoutée étant alors faible, le pH était encore voisin de la neutralité dans les deux cas.

Cholestérol.

Pour le cholestérol total, les phénomènes sont absolument comparables. Pour des quantités minimes de savon, les deux courbes sont à peu près identiques, puis lorsque la quantité de savon s'élève, l'extraction se fait mieux à pH 7 qu'à un pH plus élevé.

Notons que lorsque l'on opère comme nous l'avons fait à des pH constamment inférieurs à 8,6 et pour des concentrations en savon pas exagérément élevées, l'extraction du cholestérol est défavorisée par une légère alcalinisation. Ceci semble contraire aux constatations de Charonnat mais il faut remarquer que Charonnat opérait en milieu franchement alcalin et nous avons toujours évité d'opérer ainsi pour ne pas risquer de dénaturer les protéides.

L'entrecroisement de nos courbes pour le cholestérol dans leur partie terminale, c'est à dire pour de hautes concentrations en savon laisse prévoir qu'effectivement dans les conditions où s'est placé Charonnat et qui sont très en dehors des limites de nos courbes, l'alcalinisation doit être favorable à l'extraction dans le cas particulier du cholestérol.

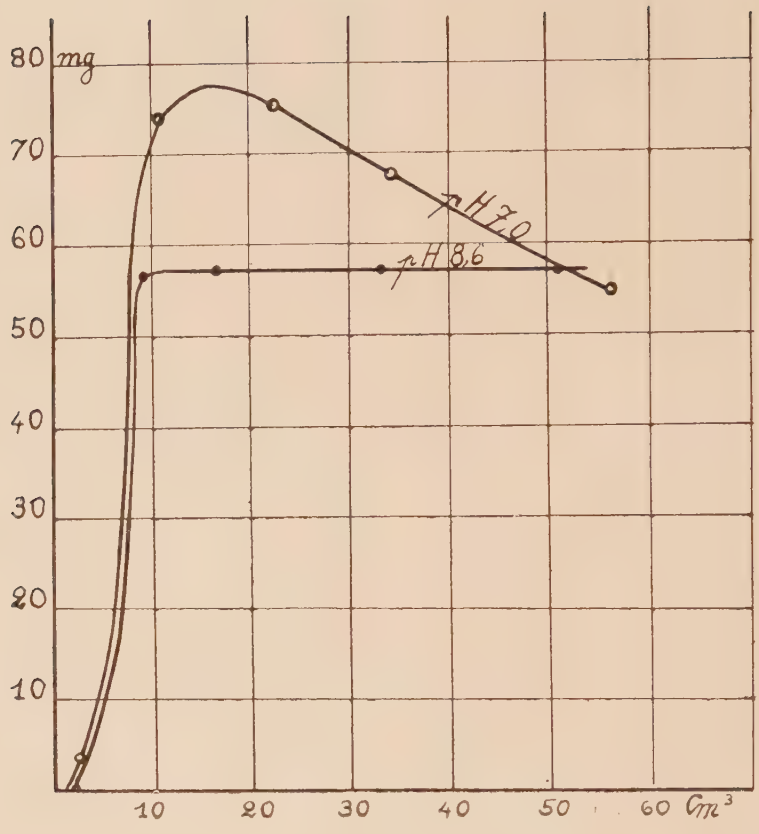


FIGURE 6

Courbes représentatives des variations de la quantité de cholestérol total en fonction de la quantité de solution de ricinoléate de sodium N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

Après avoir remarqué par ces essais préliminaires que le pH jouait un rôle important dans la délipidation du sérum, nous avons pensé qu'une étude plus détaillée de ce rôle pouvait être intéressante.

Nous avons donc étudié les variations du phénomène en déterminant le pH du mélange sérum-savon et non plus seulement celui de la solution de savon ajoutée au sérum.

Dans une série de boules à décantation, nous avons placé 20 cm³ de sérum de cheval, puis 4 cm³ de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 (optimum). A l'aide de quantités de soude croissantes, nous avons, dans la série des boules, fait graduellement monter le pH. Après avoir agité et laissé en repos six jours, nous avons recueilli les phases éthérées dans lesquelles nous avons, comme précédemment, dosé les lipides, le phosphore lipidique et le cholestérol total.

Nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau N° 5.

TABLEAU V.

Cm3 de solution de dibromostéarate de K N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	pH	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
20	7,3	909	1,4	63
20	7,6	371,5	0,4	24
20	8,1	258,5	0,9	28

Les résultats obtenus dans l'essai comparatif préliminaire se sont confirmés comme le montrent les courbes des figures 7, 8 et 9.

Plus le milieu devient alcalin, moins la quantité de substances que peut dissoudre l'éther à l'optimum est grande, ceci était à prévoir car l'extrait éthéré est très riche en acide gras provenant du savon, or ce savon est d'autant moins hydrolysable que le milieu est plus alcalin. Les courbes des figures 8 et 9 qui correspondent aux phosphatides et au cholestérol ont une allure fort différente de la courbe N° 7. Elles montrent que le passage de ces substances dans l'éther en présence de la quantité optimale de savon se fait moins bien à un pH proche de 7,7 qu'à n'importe quel pH voisin. Le fait est surtout très net dans le cas des phosphatides.

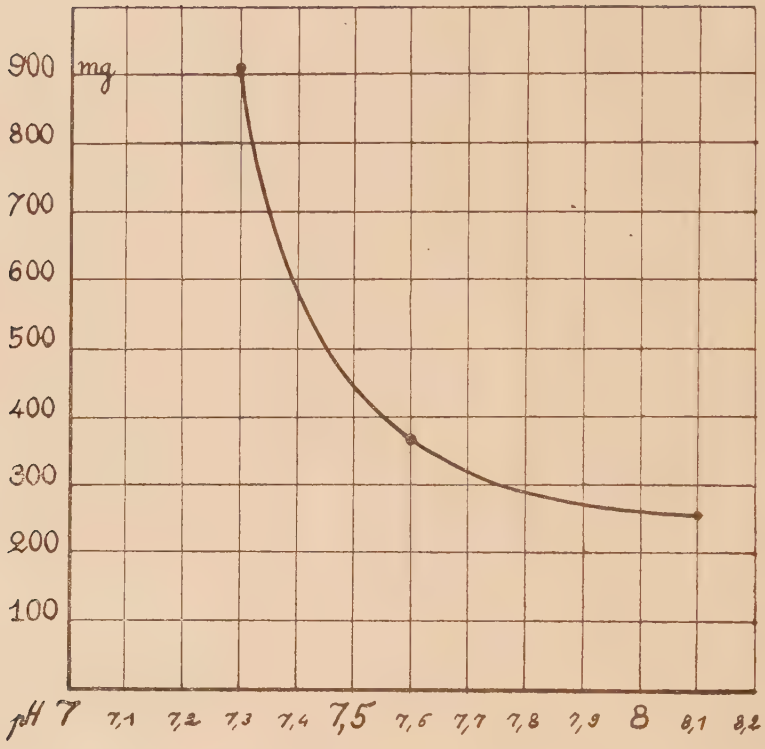


FIGURE 7

Courbe représentative des variations, en fonction du pH, de la quantité d'extrait éthéré total obtenu en présence de la quantité de savon correspondant à l'optimum.

Ceci prouve une fois encore que le passage des lipides du sérum dans l'éther n'est pas simplement conditionné par le passage de l'acide gras du savon dans cet éther ; il n'y a aucun parallélisme entre ces deux passages.

Comment expliquer qu'il existe un minimum d'action du savon vers pH 7,7 ? Comment concevoir que le savon en milieu un peu plus acide ou un peu plus alcalin fasse passer plus de lipides dans l'éther ?

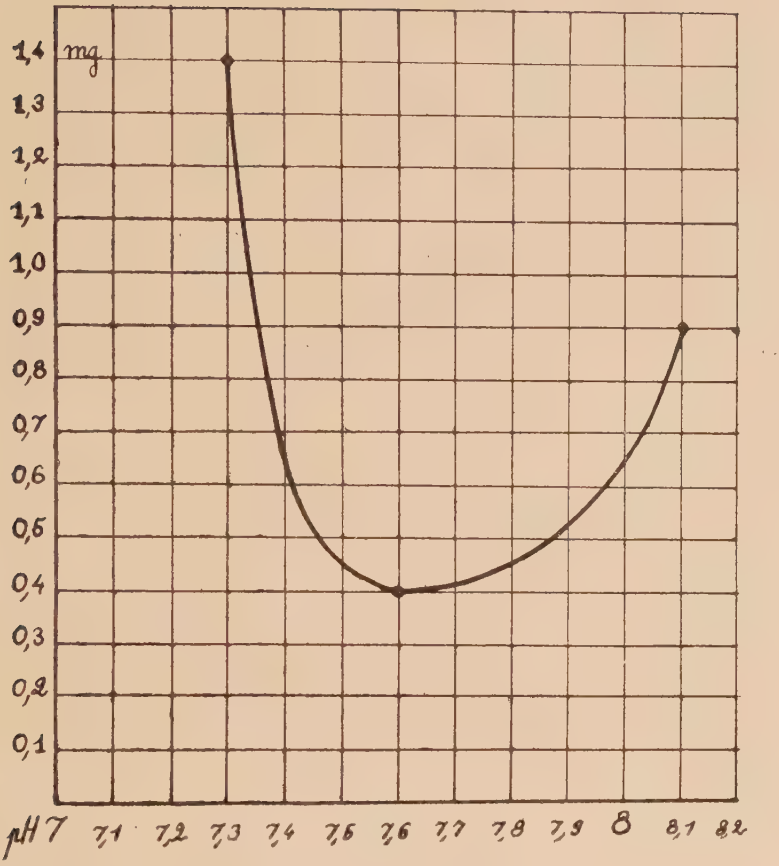


FIGURE 8

Courbe représentative des variations, en fonction du pH, de la quantité de phosphore lipidique en présence de la quantité de savon correspondant à l'optimum.

Nous ne pouvons pas proposer une hypothèse très satisfaisante à ce sujet. Il est évident que le phénomène est fort complexe ; le pH influe à la fois sur l'ionisation des protéides, sur leur hydratation, sur la stabilité des complexes savons-lipides, sur l'hydrolyse des savons et sur la stabilité même des cénapses du sérum.

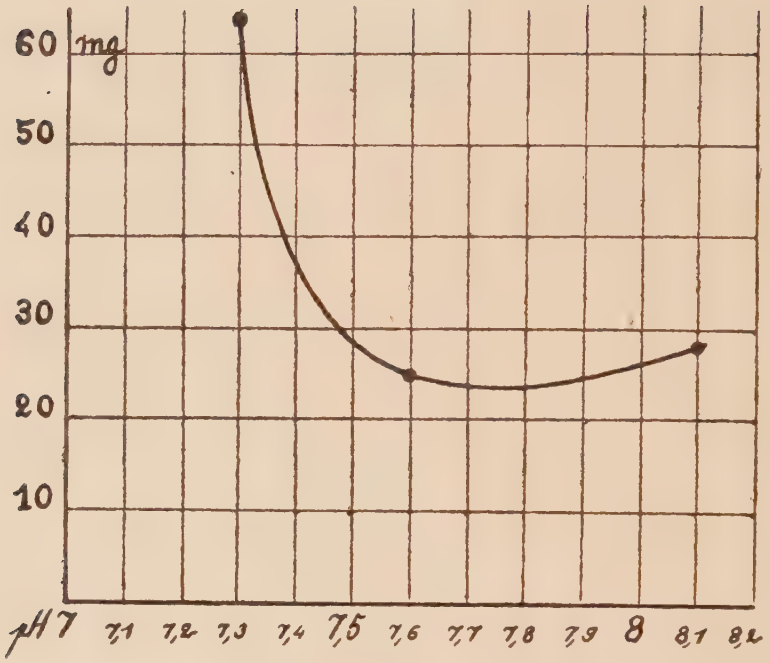


FIGURE 9

Courbe représentative des variations, en fonction du pH, de la quantité de cholestérol total obtenue en présence de la quantité de savon correspondant à l'optimum.

Conclusions

On conçoit bien que le pH soit un facteur assez important du phénomène résultant que nous étudions, mais son action est trop complexe pour que nous puissions relier par une théorie précise tous les détails de son action. Notons d'ailleurs que dans les limites de pH entre lesquelles nous nous sommes tenu (pH 7 à 8,1), le pH ne constitue qu'un paramètre assez secondaire du phénomène étudié.

Influence du temps de contact du sérum avec le savon et l'éther sur le passage des substances lipoïdiques dans l'éther

Dans nos tout premiers essais, dont nous ne rapportons d'ailleurs pas les résultats ici, nous n'avions pas envisagé la possibilité d'une intervention importante du facteur durée sur nos résultats et nous pratiquions la séparation des phases éther et sérum, lorsque ces phases étaient bien séparées par décantation après un temps de contact quelconque. Des irrégularités notables dans certaines courbes nous ont fait soupçonner un rôle non négligeable à la durée de contact entre l'éther et le sérum additionné de savon. Nous avons donc cherché à préciser ce rôle et nos expériences nous ont amené à faire quelques constatations fort curieuses.

Un essai préliminaire très simple a confirmé l'importance du temps de contact : à 20 cm^3 de sérum de cheval, nous avons ajouté 3 cm^3 d'une solution d'oléate de sodium à 21 p. 100 et 20 cm^3 d'éther ; nous avons agité, puis laissé en repos. Après deux heures, les deux phases étaient bien séparées, nous avons prélevé 5 cm^3 de l'éther surnageant puis nous avons laissé le reste en contact sans agitation.

Le lendemain, nous avons prélevé à nouveau 5 cm^3 de la phase éthérée, enfin le sixième jour, nous avons encore prélevé 5 cm^3 d'éther. Dans ces trois prises d'essai, nous avons dosé le cholestérol ; les quantités trouvées furent très différentes : les 5 cm^3 prélevés après deux heures contenaient seulement des traces de cholestérol, tandis que les échantillons d'éther prélevés après vingt quatre heures et après six jours contenaient respectivement 0,35 mg et 2 mg de cholestérol.

Le temps de contact, tout au moins en ce qui concerne le cholestérol, est donc un facteur primordial. Nous avons poursuivi cette étude : pour cela, nous avons tracé les courbes représentatives de l'extraction du cholestérol et des phosphatides

en fonction de la quantité de savon ajoutée au sérum pour un contact éther-sérum de deux jours et pour un contact de six jours. Le savon utilisé ici fut le dibromostéarate de potassium.

Dans le tableau N° 6 sont rassemblés les résultats expérimentaux obtenus au cours de ces essais ; ces chiffres nous ont permis de tracer les courbes des figures N° 10, 11 et 12.

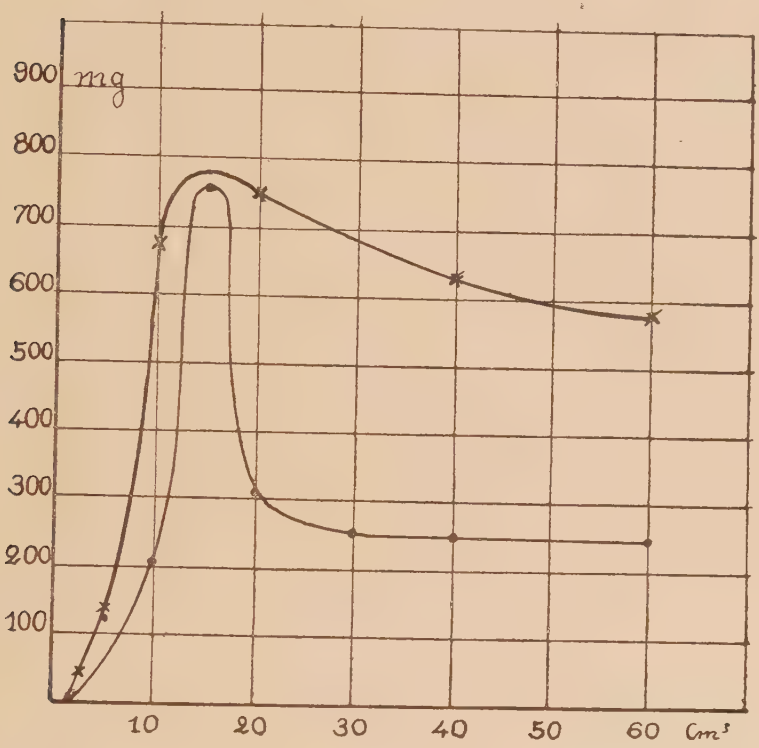
Notons que les courbes tracées pour six jours de contact ont déjà été reproduites ci-dessus (figures N° 1, 2 et 4).

TABLEAU VI.

Durée du contact	Grammes d'acide gras correspondant au savon ajouté à 100 cm3 de sérum	Cm3 de dibromostéarate de K N/2,28 ajoutés à 100 cm3 de sérum	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
6 jours	0,484	2,5	49,0	0	1,9
	0,969	5	137,5	0,15	4,4
	1,938	10	680,0	0,85	46
	3.876	20	748,0	1,00	68
	7,752	40	635,0	0,30	22
	11,620	60	584,5	0,25	15,4
2 jours	0,969	5	127,5	0	0,3
	1,938	10	207,0	0,14	6,2
	2,917	15	759,5	0,90	32,5
	3,876	20	306,5	0,23	5,3
	5,814	30	257,5	0,05	5,2
	7,752	40	255,5	0,05	5,0
	11,628	60	250,0	0,025	3,8

L'examen des courbes révèle tout d'abord que dans tous les cas, l'optimum correspond à une même concentration en sa-

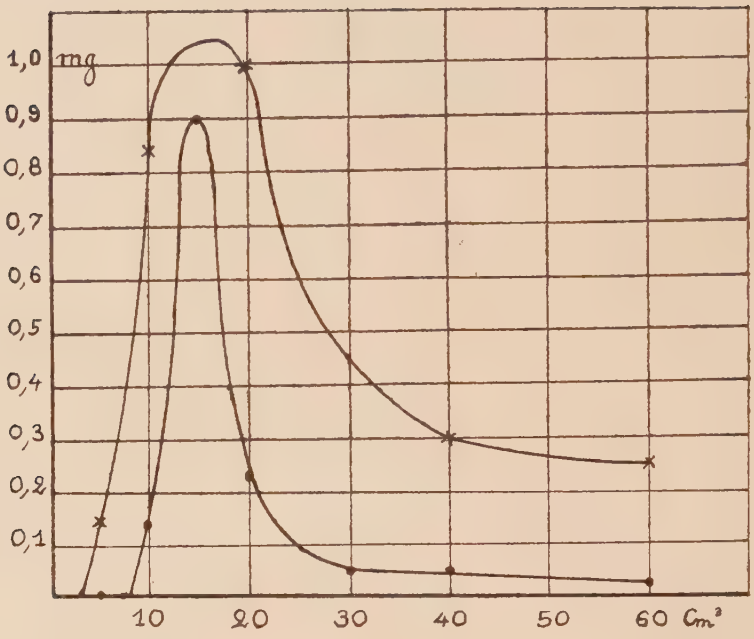
von. La durée du contact éther-sérum ne modifie donc pas la position de l'optimum par rapport à la concentration en savon ; mais la quantité de substances qui passent dans l'éther à l'optimum est notablement modifiée par la durée du contact, surtout en ce qui concerne le cholestérol.



× = 6 jours ; . = 2 jours

FIGURE 10

Courbes représentatives des variations de la quantité d'extrait éthéré total en fonction de la quantité de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

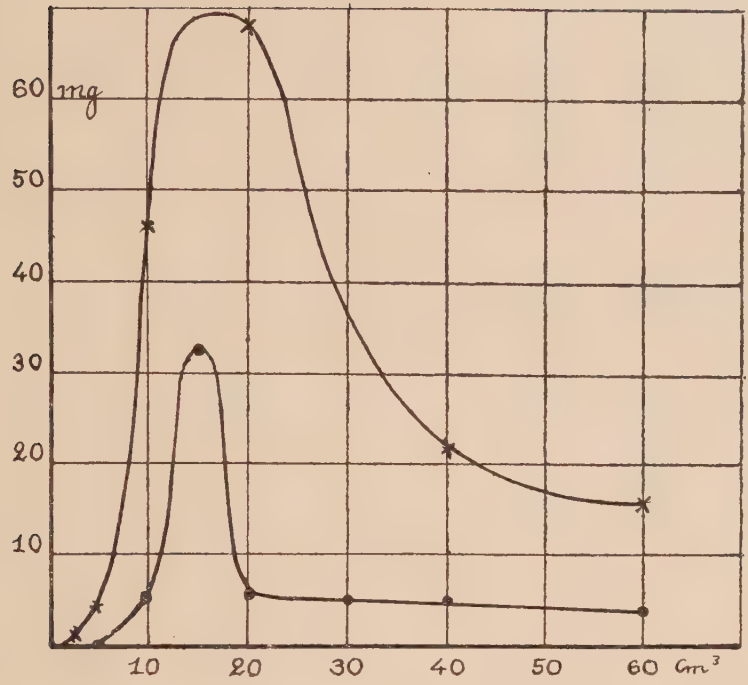


× = 6 jours ; . = 2 jours

FIGURE 11

Courbes représentatives des variations de la quantité de phosphore lipidique en fonction de la quantité de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

Un fait curieux est à noter ici : pour les fortes concentrations en savon, la quantité d'acide gras provenant du savon et passant dans l'éther croit considérablement en fonction du temps et, même après deux jours de contact, il continue à passer d'abondantes quantités d'acide gras dans l'éther, or après deux jours, les phases aqueuses et éthérées étaient bien séparées et bien limpides ; l'hydrolyse du savon se poursuit lentement et pendant très longtemps. Nous avons opéré à l'abri de l'air, dans des boules à décanter bouchées à l'émeri, ce n'est donc pas l'intervention de gaz carbonique de l'atmosphère qui peut avoir fait poursuivre la décomposition du savon.



× = 6 jours ; . = 2 jours

FIGURE N° 12

Courbes représentatives des variations de la quantité de cholestérol total en fonction de la quantité de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, ajoutée à 100 cm3 de sérum de cheval.

Nous nous trouvons, ici encore, en présence d'un phénomène très complexe et nous ne pouvons pas préciser le mode d'action de tous les facteurs. Au contraire, lorsque la concentration en savon correspond à l'optimum, l'extraction est presque terminée, en quarante huit heures, sauf pour le cholestérol dont le passage dans l'éther, même à l'optimum est très lent et se poursuit pendant longtemps.

Il faut admettre que la décomposition des cénapses lipido-protéidiques par le savon constitue une réaction à vitesse très limitée et de plus, il faut penser que cette réaction est favorisée par l'éther. D'ailleurs, ceci se conçoit bien puisque lorsque l'éther est présent, il enlève les lipides au fur et à mesure de

leur libération par les savons et peut contribuer ainsi à l'arrachement de ces lipides en les empêchant d'intervenir comme facteurs d'un équilibre.

Machebœuf et Sandor avaient déjà noté l'influence prépondérante du facteur durée de contact dans l'extraction de lipides du sérum par de l'éther, en présence de petites quantités d'alcool. Nos résultats sont à rapprocher des leurs. Le savon, comme l'alcool, tend à décomposer les cénapses protéidolipidiques en libérant les lipides, mais cette action est progressive et lente. Dans le cas des savons, certaines cénapses sont rapidement décomposées ; un précipité lipidique abondant apparait presque instantanément lorsque l'on ajoute la quantité optimale de savon au sérum, mais d'autres cénapses ne sont décomposées que beaucoup plus lentement et il semble que pour ces cénapses, la combinaison des actions de l'éther et du savon soit nécessaire à la décomposition. D'autres cénapses enfin restent insensibles à l'action combinée de l'éther et du savon, puisque, même pour la quantité optimale de savon et même après longtemps, il reste encore des lipides non arrachés au sérum par l'éther, même si l'acide gras du savon est celui qui est le plus favorable.

Nous avons en effet constaté dès l'emblée que, si les divers savons essayés avaient tous une activité de même genre, ces activités n'étaient pas égales ; la comparaison de l'action des divers savons fera l'objet d'un chapitre ultérieur.

Un autre chapitre sera réservé à la recherche de données expérimentales sur celles des cénapses du sérum, qui ne sont pas détruites par les actions combinées du savon et de l'éther.

Nous n'abandonnerons pas l'étude du facteur durée avant de rapporter une autre série d'expériences que nous avons effectuées à son sujet et qui ont permis de préciser les modalités de son action :

Dans cette série d'expériences, nous avons placé dans vingt ampoules à décantation disposées en quatre séries, 20 cm^3 d'un même sérum de cheval ; aux ampoules de la première série, nous avons ajouté 1,5 cm^3 de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 dont le pH était 7,1. A celles de la deuxième série, il fut ajouté 3 cm^3 de solution de savon. Celles

TABLEAU VII.

Durée du contact	Cm3 de solution de dibromo-stéarate de K N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
6 heures		90,0	0,05	2,6
1 jour		93,5	0,05	2,8
3 jours	7,5 cm3	132,0	0,05	4,6
6 jours		159,0	0,05	7,2
12 jours		160,0	0,05	
6 heures		100,0	0,15	4,7
1 jour		101,5	0,25	5,0
3 jours	15 cm3	195,0	0,30	5,7
6 jours		372,0	0,50	23,2
12 jours		375,0	0,50	23,3
6 heures		200,5	0,25	6,0
1 jour		201,0	0,30	7,5
3 jours	20 cm3	300,0	0,36	15,8
6 jours		909,0	1,40	62,0
12 jours		910,0	1,42	62,5
6 heures		153,5	0,25	0,6
1 jour		193,5	0,30	2,0
3 jours	30 cm3	538,0	0,52	7,4
6 jours		731,5	0,70	16,4
12 jours		728,0	0,68	

de la troisième série en reçurent 4 cm³ et celles de la quatrième série 6 cm³. Nous avons agité avec précaution, puis, après avoir placé dans chaque ampoule 20 cm³ d'éther, nous avons agité de nouveau. Nous avons alors soutiré les phases aqueuses après les temps variables pour peser l'extrait éthéré et y pratiquer les dosages de phosphore et de cholestérol.

Les résultats obtenus ramenés à 100 cm³ de sérum sont indiqués dans le tableau N° 7.

Les résultats obtenus pour l'extrait éthéré total nous ont permis de tracer les courbes de la figure N° 13. *(1)*

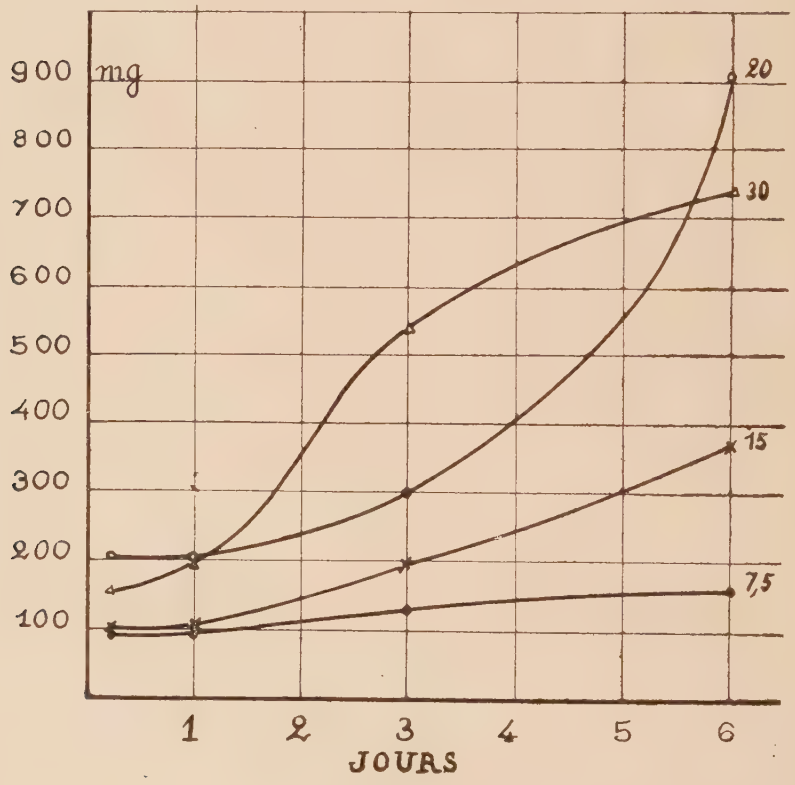


FIGURE 13

Courbes représentatives des variations de la quantité de substances éthérosolubles extraites de 100 cm3 de sérum de cheval en présence de quantités variables de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, en fonction de la durée de contact entre le sérum, le savon et l'éther.

(1) Notons que nous n'avons pas tracé les courbes au delà du sixième jour, car il n'y a pas de variations entre le sixième et le douzième jour.

Ces courbes nous permettent de constater que l'extraction des substances lipoïdiques en fonction du temps pour des concentrations faibles n'augmente que très faiblement avec le temps. Si la concentration en savon est plus grande, la quantité de substances lipoïdiques extraites varie nettement en fonction du temps ; elle est en effet presque deux fois plus importante après six jours qu'après trois jours de contact. Si la concentration est optimale, les variations sont considérables ; pendant une phase préparatoire qui dure près de deux jours, la quantité de lipides extraits ne varie guère puis la vitesse d'extraction augmente de plus en plus jusqu'à ce que l'extrait atteigne sa valeur maxima. Enfin, pour une concentration en savon beaucoup plus importante, la courbe monte au début assez rapidement puis la vitesse d'extraction diminue ensuite avec le temps.

Comment interpréter l'ensemble de ces résultats ?

On peut penser que parmi les diverses cénapses que peut décomposer le savon, il en est dont la stabilité est très faible et d'autres au contraire qui sont plus stables.

Si l'on ajoute très peu de savon, ce sont les cénapses les moins stables qui sont détruites rapidement et tout le savon se fixe aux protéides ou aux lipides libérés ; il ne reste pas de savon libre en excès ; il ne peut donc pas y avoir, dans les heures ou les jours qui suivent, une action quelconque du savon sur les cénapses plus stables qui n'ont pas été décomposées.

Si au contraire la quantité de savon ajoutée au sérum est plus élevée, les cénapses peu stables sont aussi instantanément décomposées, mais il reste un excès de savon libre qui ne décompose que lentement les cénapses plus stables. Ceci expliquerait assez bien l'évolution du phénomène en fonction du temps, lorsque la quantité de savon est faible et aussi lorsque cette quantité est plus élevée, voisine de l'optimum par exemple.

Les variations du phosphore lipidique, en fonction du temps de contact sérum-savon-éther et pour des quantités variables de savon, sont schématisés dans la figure 14.

Pour le phosphore lipidique, les variations sont encore plus

nettes que pour l'extrait éthéré total et elles semblent être en parfait accord avec l'interprétation que nous venons de proposer.

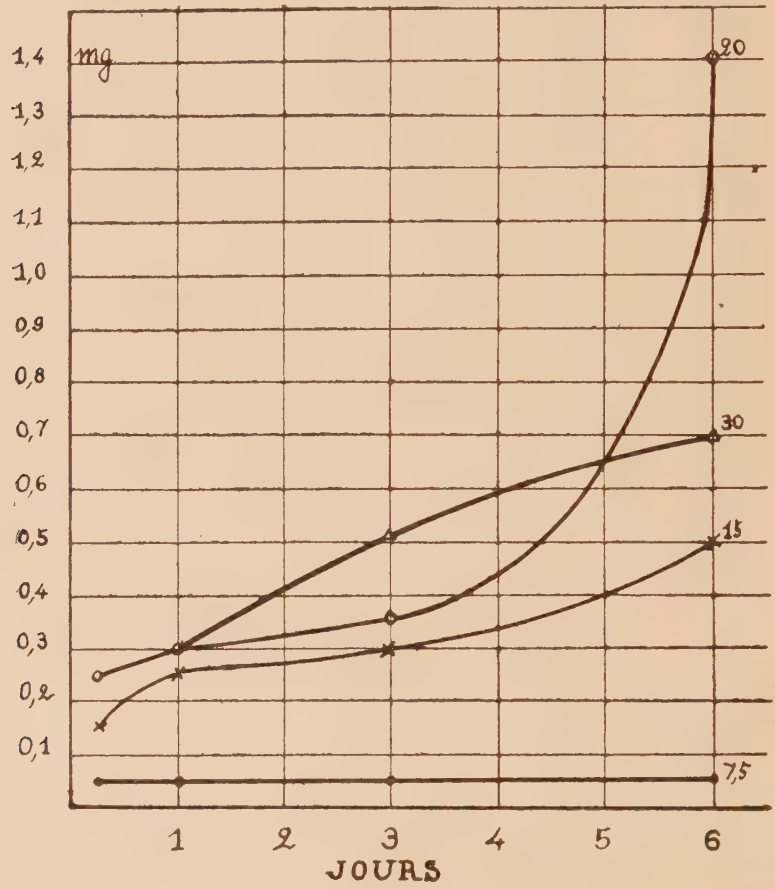


FIGURE 14

Courbes représentatives des variations de la quantité de phosphore lipidique extraite de 100 cm3 de sérum de cheval en présence de quantités variables de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, en fonction de la durée de contact entre le sérum, le savon et l'éther.

Les courbes de la figure 15 représentent les variations du cholestérol total extrait de 100 cm³ de sérum en fonction du temps de contact sérum-savon-éther et pour des concentrations variables en savon.

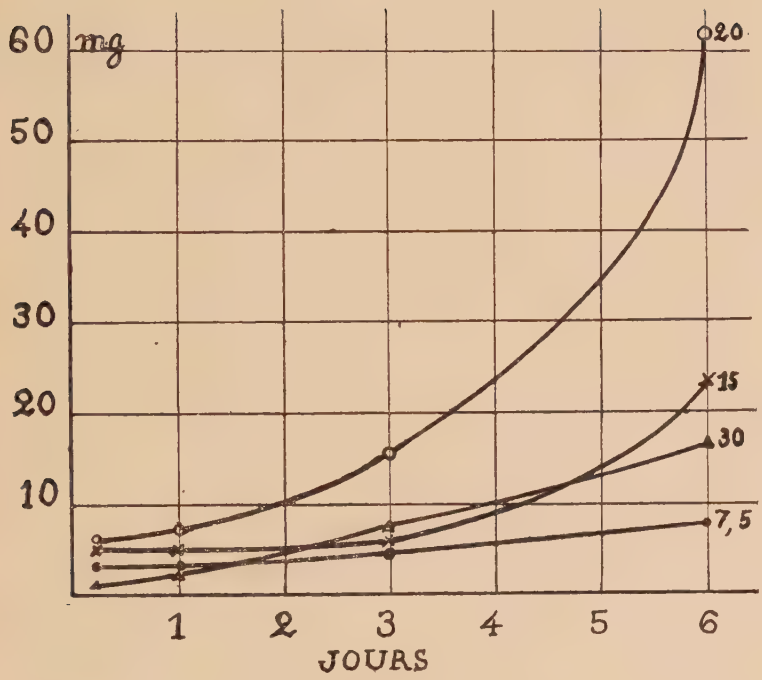


FIGURE 15

Courbes représentatives des variations de la quantité de cholestérol total extraite de 100 cm3 de sérum de cheval en présence de quantités variables de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, en fonction de la durée de contact entre le sérum, le savon et l'éther.

Dans le cas particulier du cholestérol, nous constatons donc aussi l'influence de la durée de contact entre le sérum et l'éther ; les courbes sont dans leur ensemble très comparables à celles obtenues pour les phosphatides.

Conclusions

Ceci nous amène encore une fois à penser que l'action du savon porte sur les protéides et non sur les substances lipoïdiques, puisque pour des substances aussi différentes que le cholestérol et les phosphatides, les modalités d'action sont tou-

jours semblables ; il ne se manifeste aucune spécificité d'action du savon vis à vis de telle ou telle substance lipoïdique ; toutes subissent son action à peu près de la même façon. Ceci est bien en accord avec notre hypothèse qui veut que l'action principale du savon soit une fixation sur les protéides en chassant les lipides qui y étaient fixés par solvatation, quels que soient ces lipides.

Influence de la dilution

On sait que les solutions de savon présentent une stabilité variable suivant leur concentration.

Il n'était donc pas impossible que la dilution de la solution de savon employée dans nos expériences exerçât une notable influence sur le phénomène que nous étudions.

Pour étudier ce problème, nous avons placé 20 cm³ de sérum de cheval et 4 cm³ de solution de linoléate de sodium N/2,28 dans deux ampoules à décantation. Dans l'une seulement de ces ampoules, nous avons ajouté 40 cm³ d'eau salée isotonique. *(1)*

Après agitation, chaque mélange fut additionné de 20 cm³ d'éther. Une nouvelle agitation suivit cette addition et l'extrait éthéré fut séparé après six jours, puis étudié comme dans les essais précédents. Nous avons obtenu les résultats exposés dans le tableau N° 8 (calculés pour 100 cm³ de sérum).

TABLEAU VIII.

	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
Sérum non dilué	596,5	1,43	70
Sérum dilué	592,0	0,75	54

(1) Nous avons utilisé de l'eau salée à 9 p. 1000 et non pas de l'eau distillée car on sait que la dilution du sérum à l'aide d'eau distillée provoque la précipitation d'une certaine fraction protéidique qui n'est soluble que si le liquide contient assez de sels.

Ces résultats nous montrent l'influence notable qu'exerce la dilution sur l'action simultanée des savons et de l'éther, bien que cette dilution n'influe pas notablement sur l'extraction de l'acide gras du savon par l'éther.

Ici, nous notons encore une fois le défaut de parallélisme entre le passage dans l'éther de l'acide du savon d'une part et le passage des lipides dans l'éther d'autre part.

Conclusions

La dilution par de l'eau du mélange savon-sérum influe notablement sur l'extraction des lipides par l'éther ; c'est la concentration du savon dans le mélange et non la masse de ce savon qui est le facteur principal de l'arrachement des lipides aux protéides.

Comparaison de l'action de divers savons sur le sérum en présence d'éther

Dans les essais qui ont été exposés dans les chapitres précédents, nous n'avons pas toujours utilisé le même savon ; nous avions vérifié que les divers savons dont la solubilité et la stabilité en solution à pH 7,1 étaient suffisantes, agissaient tous d'une façon assez comparable ; ceci nous suffisait pour des essais préliminaires, mais nous avons voulu préciser les légères différences pouvant exister entre les actions de ces divers savons. Une étude plus détaillée nous avait montré en effet que ces différences n'étaient pas négligeables.

Il était pour nous important en outre de savoir, si la présence, dans la chaine polyméthylénique d'un acide gras, de diverses fonctions chimiques telles que des fonctions alcool ou des halogènes, n'influait pas fortement sur le phénomène que nous étudions.

Dans une première série d'essais, nous avons tracé les courbes d'extraction pour toute une série de savons, mais comme de telles expériences sont très longues et nécessitent d'autre part des volumes considérables de sérum, nous n'avons pas pu opérer tous ces essais en une seule fois et sur un même sérum de cheval.

La comparaison entre les savons n'est donc pas rigoureuse et de légères différences peuvent résulter du fait que les divers sérums de chevaux ne se comportent pas identiquement.

Malgré celà, la situation de l'optimum pour les divers savons à dix huit atomes de carbone, que nous avons pu étudier, est toujours à très peu près la même. Seules diffèrent assez notablement les quantités de lipides extraits par l'éther à l'optimum.

Pour vérifier que ces différences d'extractibilité à l'optimum n'étaient pas le fait des différences entre les sérums, nous avons effectué un essai sur un même sérum pour tous les savons, mais en nous plaçant seulement alors en présence de la concentration optimale de chacun des savons. Cet essai, que nous décrirons plus loin, confirme, nous le verrons, le premier essai plus complet qui sera décrit tout d'abord.

Dans ce premier essai d'ailleurs, nous avons opéré sur un nombre de sérums moins grand que le nombre de savons étudiés si bien que plusieurs savons furent étudiés sur un même sérum ; c'est ainsi que les chiffres rapportés dans le tableau N° 9 pour les acides oléique et dibromostéarique ont été obtenus pour un même sérum (Sérum N° 11). Il en fut de même pour les acides ricinoléique et undécylénique (Sérum N° 12).

Nos résultats nous ont permis de tracer les familles de courbes qui sont reproduites dans les figures N° 16, 17, 18, 19, 20 et 21.

Pour les acides saturés tels que les acides stéarique et palmitique, la stabilité du savon à pH 7,2 et sa solubilité dans l'eau sont si faibles qu'il est impossible d'obtenir une solution ayant une concentration suffisante pour que l'on puisse ajouter une quantité de savon correspondant à l'optimum et il est même impossible de mettre en évidence, avec les solutions très diluées de ces savons que l'on peut préparer à ce pH, une précipitation quelconque des lipides du sérum ou un passage de ces lipides dans l'éther.

D'ailleurs, même si l'on ajoute au sérum un très grand volume de ces solutions de savon, la quantité de savon ainsi ajoutée est infime et ne correspond qu'à une fraction de centimètre cube de la solution hypothétique équimoléculaire N/2,28 dont les volumes sont portés en abcisses sur nos courbes. Nous n'avons donc pas fait figurer sur nos schémas les courbes correspondant à ces acides, elles seraient réduites à un infime fragment de droite s'éloignant à peine de l'origine des coordonnées.

Pourtant, pour l'acide undécylique dont la molécule ne contient que onze carbones, la solubilité du savon à pH 7,2 est un peu plus élevée et nous avons pu constater une action sur

TABLEAU IX.

Acides gras correspondant aux savons utilisés	Poids en grammes d'acide gras ajouté à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Cm3 de solution de savon N/2,28 ajoutés à 100 cm3 de sérum	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
Linoléique	0,650	5,2	215,0	0,48	12,7
	1,300	10,5	561,5	1,45	64
	2,600	21,0	684,5	1,15	80
	5,200	42,0	501,0	0,55	42
	7,800	63,0	503,0	0,20	36
Ricinoléique (sérum N° 12)	0,370	2,8	136,5	traces	2,8
	1,480	11,3	690,5	1,62	74
	2,960	22,6	865,5	0,57	75
	4,440	33,9	942,0	0,57	67
	7,400	56,4	980,0	0,54	54
Di-Bromostéarique (sérum N° 11)	0,484	2,5	49,0	0	1,9
	0,969	5	137,5	0,15	4,4
	1,938	10	680,0	0,85	46
	3,876	20	748,0	1,00	68
	7,752	40	635,0	0,30	22
	11,620	60	584,5	0,25	15,4
Oléique (sérum N° 11)	0,280	2,2	37,5	0	0,7
	0,565	4,5	133,5	0	6,2
	1,130	9,1	469,0	0,85	46
	2,260	18,2	675,0	0,90	55
	4,520	36,4	727,0	1,40	59
	6,780	54,6	882,5	0,15	66
Stéarique	0,053	0,1	17	0	0
	0,106	0,2	23	0	0
	0,212	0,4	29	0	0

TABLEAU X.

Acides gras correspondant aux savons utilisés	Poids en grammes d'acide gras ajouté à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Cm3 de sodium N/2,28 ajoutés à 100 cm3 de sérum	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
Undécylique	0,083	1	137,5	0,15	0
	0,166	2	275,5	0,13	3,8
	0,249	3	320,5	0,02	3,8
	0,416	5,1	408,0	0,008	5,9
	0,582	7,1	458,5	0	13,8
	0,748	9,2	497,5	0	14,0
	0,998	12,2	553,0	0	15,0
undécylénique (sérum N° 12)	0,993	12,3	238,5	0,36	1,3
	1,986	24,6	419,0	0,75	28
	3,972	49,2	592,5	0,50	32
	6,951	86,1	717,0	0,39	33
	9,930	123,0	992,0	0,34	56
Sébacique	0,670	15	15,3	0	1,0
	1,340	30	13,5	0	1,4
	2,680	60	16,5	0	1,5
	4,020	90	18,0	0	1,5
	6,700	150	23,5	0	2,4

les lipides avec même un optimum, mais le volume de solution qu'il fallait ajouter au sérum pour que la quantité d'undécylate soit suffisante était considérable, or nous avons déjà vu que la dilution du sérum influe considérablement sur le phénomène que nous étudions en diminuant l'extractibilité des lipides. La courbe correspondant à l'acide undécylique n'est donc pas comparable aux autres courbes qui figurent sur les

schémas ; nous ne l'y avons fait figurer que pour mémoire et pour rappeler que, pour cet acide également, le « décollage » des lipides sériques est possible.

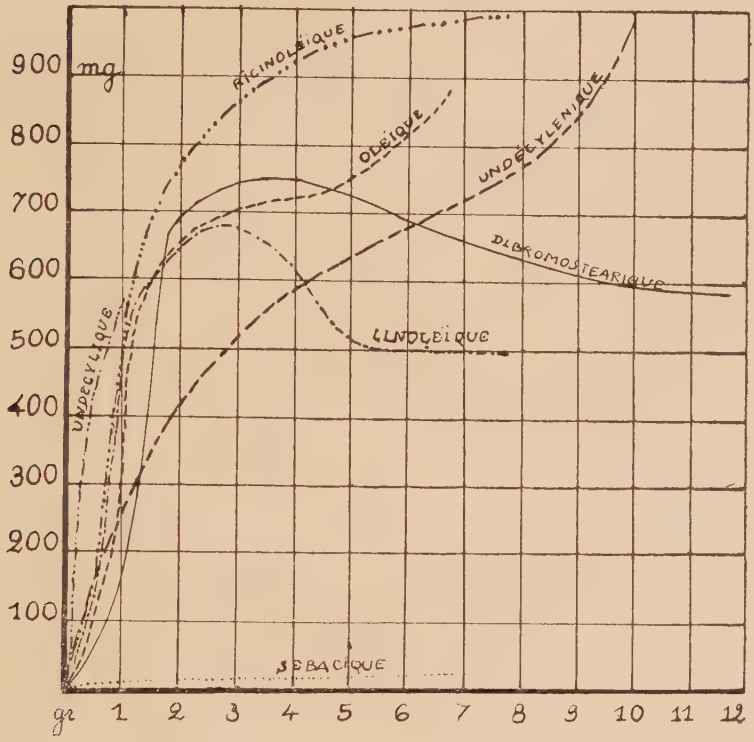


FIGURE 16

Courbes représentatives des variations du poids d'extrait éthéré total en fonction du poids d'acide gras correspondant au savon ajouté à 100 cm3 de sérum.

En résumé, il faut donc, pour que l'activité d'un savon soit nette, que ce savon soit très soluble et stable à pH 7,1-7,2 ; cette condition n'est remplie que pour les acides ayant dans leur molécule une fonction éthénique, une fonction alcoolique ou, comme l'acide dibromostéarique, des halogènes.

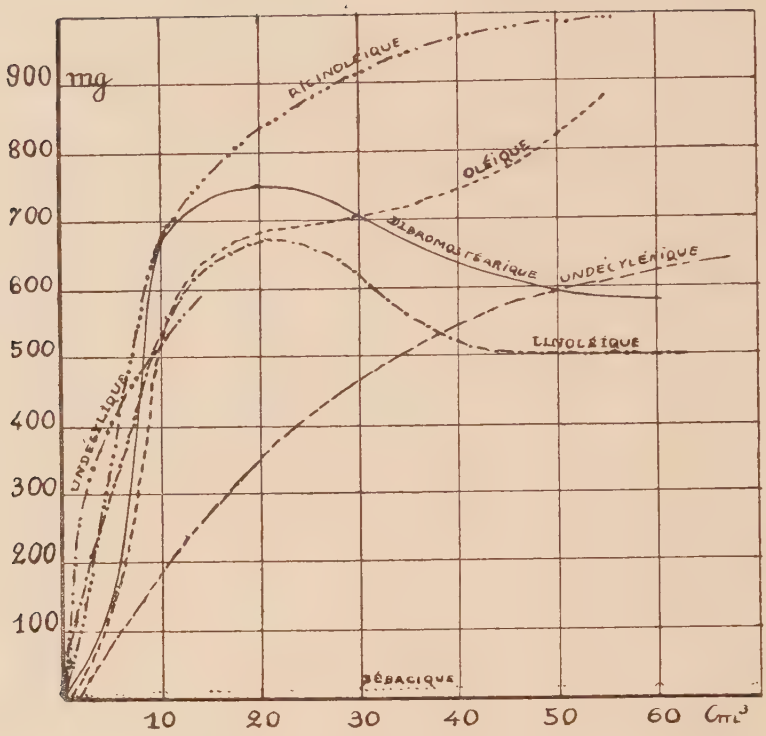


FIGURE 17

Courbes représentatives des variations du poids d'extrait éthéré total en fonction du volume de solution de savon N/2,28, ajouté à 100 cm3 de sérum.

Ces fonctions chimiques augmentent l'hydrophilie de la molécule du savon ; or nous avions effectivement postulé, dans notre hypothèse de travail, une hydrophilie nette et une solubilité dans l'eau des molécules à chaines polyméthyléniques que nous cherchions à faire agir sur les cénapses lipidoprotéidiques du sérum.

Lorsqu'à l'acide gras étudié correspond un savon bien soluble et bien stable à pH 7,1, nous avons toujours préparé une solution N/2,28 de savon car cette concentration est la concentration maximale que l'on puisse obtenir facilement pour les divers savons les plus actifs que nous avons étudiés.

En examinant les courbes de la figure N° 16 on constate que l'extrait éthéré total ne passe pas toujours par un maximum ; l'étude de l'extrait éthéré total nous intéresse relativement peu, car le phénomène est trop complexe : l'hydrolyse du savon et le passage de son acide gras dans l'éther se surajoute en effet ici à ce qui nous intéresse, c'est à dire au passage des lipides du sérum dans l'éther.

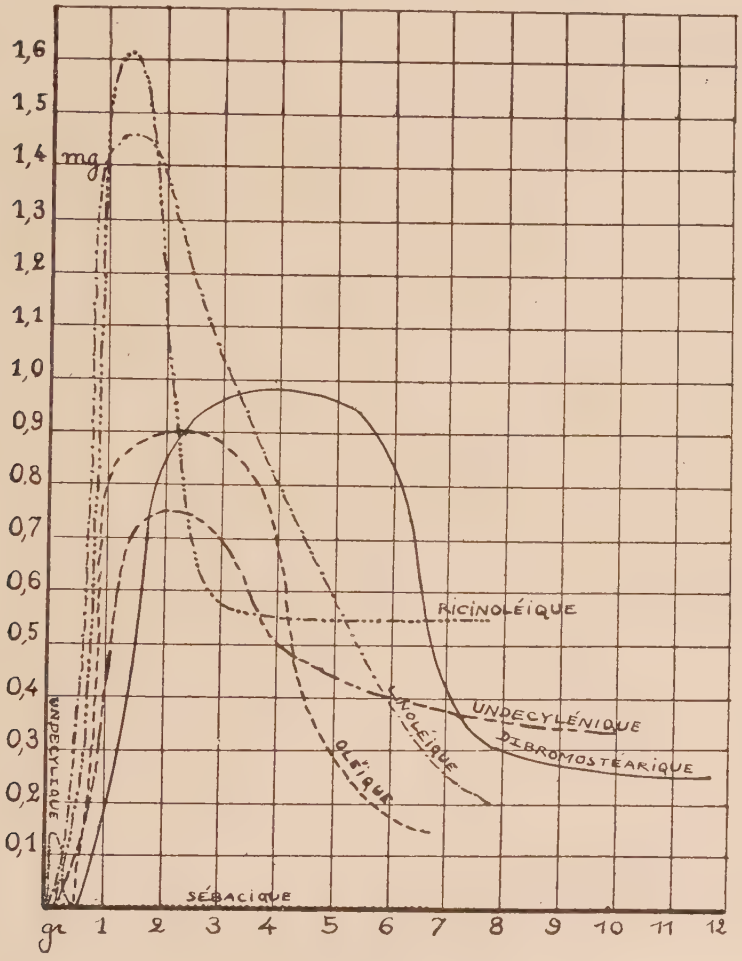


FIGURE 18

Courbes représentatives des variations du poids de phosphore lipidique en fonction du poids d'acide gras correspondant au savon, ajouté à 100 cm3 de sérum.

Un maximum existe pour l'extrait éthéré total lorsque le savon en excès est capable d'empêcher considérablement le passage dans l'éther de l'acide gras libéré par hydrolyse partielle du savon.

Si par contre on n'étudie que le passage des phosphatides dans l'éther (figure N° 19), on constate que l'existence d'un

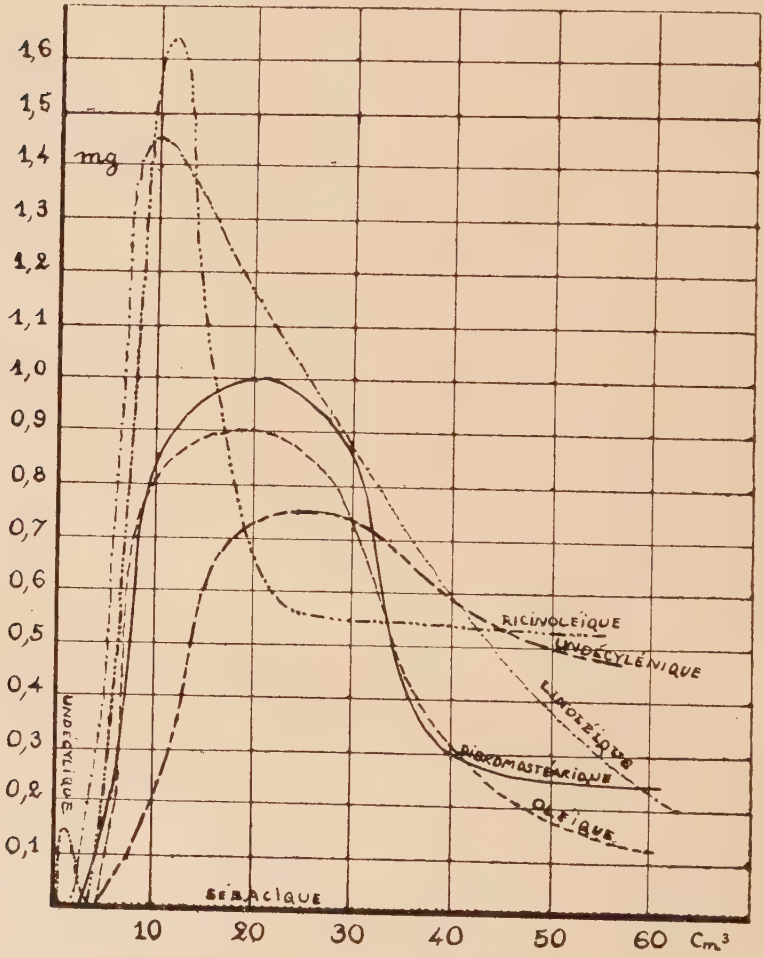


FIGURE 19

Courbes représentatives des variations du poids de phosphore lipidique en fonction du volume de solution de savon N/2,28, ajouté à 100 cm3 de sérum.

maximum est un fait absolument général et le maximum est toujours très net. Tous les savons sont capables, lorsqu'ils sont en excès, de retenir dans la phase aqueuse les phosphatides et de les empêcher de passer dans l'éther.

Le fait n'est pas toujours aussi net lorsqu'il s'agit du cholestérol (figure N° 21). Pour les acides qui ne possèdent pas dans leur chaine polyméthylénique d'autre fonction qu'une simple fonction éthénique (acide oléique, acide undécylénique), on ne constate pas l'existence d'un maximum aussi caractéristique : une simple inflexion ou un simple changement brusque du rayon de courbure de la courbe correspond à la concentration moléculaire qui, pour les autres savons, constitue un maximum. Ces savons ne se combinent pas aussi bien que les autres au cholestérol pour donner des complexes hydrophiles ; leur excès ne semble pas empêcher aussi bien le passage du cholestérol dans l'éther.

Pour voir si la fonction acide avait une influence fondamentale sur le phénomène que nous étudions, nous avons effectué une expérience avec le sel de sodium d'un diacide à chaine polyméthylénique assez longue, l'acide sébacique qui, on le sait, est le diacide saturé à neuf carbones ; ce sel s'est montré à peu près sans action sur les lipides du sérum ; tout au plus peut-on noter à son sujet une très faible action sur le cholestérol.

Ce n'est donc pas le fait d'introduire dans le sérum des sels organiques de sodium à une concentration élevée qui détache les lipides et les fait passer dans l'éther, c'est bien à la partie polyméthylénique des molécules des savons qu'il faut imputer l'action que nous constatons. Dans l'acide sébacique, cette action est freinée par la présence des deux fonctions acides qui sont aux extrémités de la chaine polyméthylénique ; ces fonctions acides confèrent aux deux extrémités de la chaine une forte hydrophilie et, comme cette chaine est relativement courte - $(CH_2)_7$ -, aucune partie de la molécule de l'acide sébacique ne présente d'affinité suffisante pour les chaines polyméthyléniques des protéides pour en arracher les lipides qui y sont fixés.

Dans les chapitres précédents, nous avions pris comme abscisses les concentrations moléculaires des savons dans le mé-

lange sérum-savon et nous avions constaté que, pour tous les savons actifs l'optimum d'action correspond à très peu près à une même concentration moléculaire en savon.

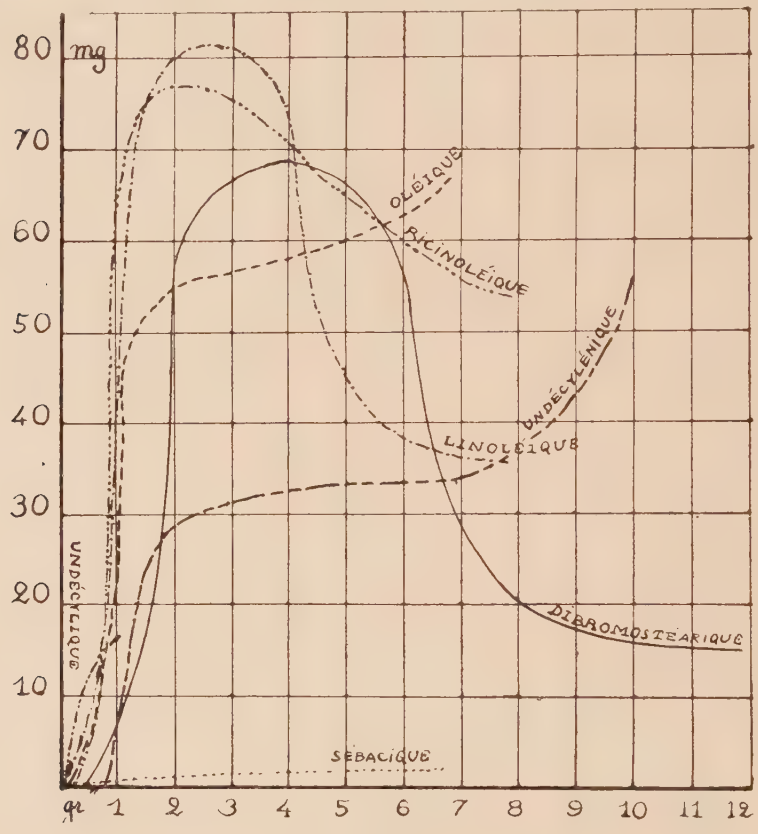


FIGURE 20

Courbes représentatives des variations du poids de cholestérol total en fonction du poids d'acide gras correspondant au savon, ajouté à 100 cm3 de sérum.

Si, au contraire, nous traçons les courbes en prenant comme abscisses les quantités absolues des divers savons présents dans les mélanges sérum-savon, nous constatons (figures 16, 18 et 20) qu'aux optima ne correspondent pas des concentrations identiques en savon.

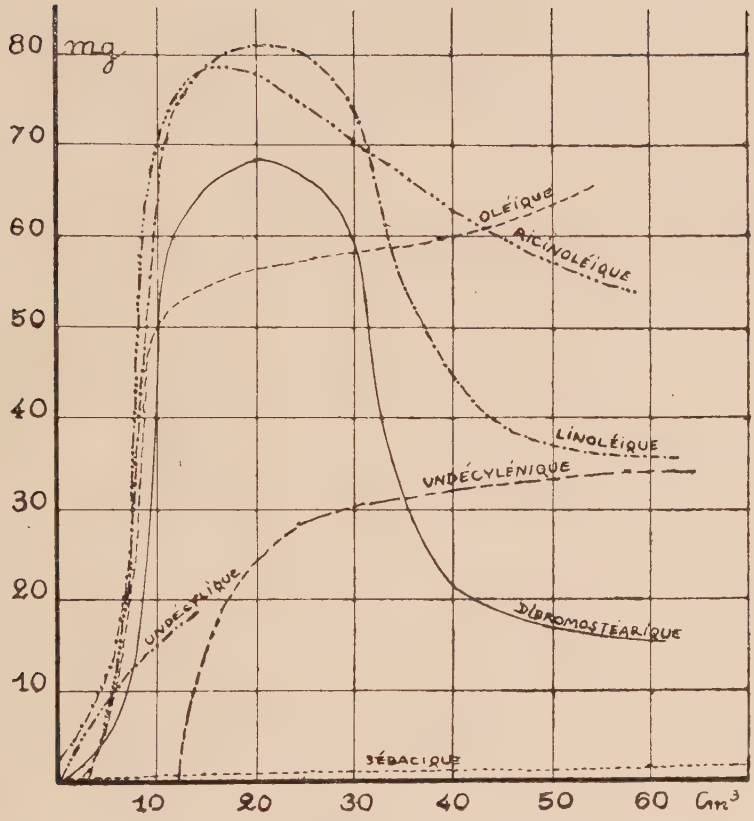


FIGURE 21

Courbes représentatives des variations du poids de cholestérol total en fonction du volume de solution de savon N/2,28, ajouté à 100 cm3 de sérum.

Ce fait est très important, car si c'est seulement pour des concentrations équimoléculaires et non pour des masses égales que les savons ont leur optimum, on peut conclure que chaque molécule agit pour son propre compte d'une façon comparable quel que soit le savon. Nous voyons ici se dessiner une loi stoechiométrique moléculaire qui rattache les phénomènes que nous étudions à des phénomènes chimiques.

Essai de l'action des divers savons sur un même sérum de cheval

Cet essai, que nous avions annoncé déjà ci-dessus, fut réalisé afin de montrer que les différences entre les quantités de lipides extraites à l'optimum étaient bien dues aux savons et non aux différences entre des sérums provenant de chevaux différents.

De plus, cet essai nous permettait de classer définitivement les divers savons suivant leur pouvoir de destruction vis à vis des cénapses lipidoprotéidiques du sérum.

Comme nous ne pouvions pas disposer d'un volume suffisant d'un même sérum de cheval pour tracer toutes les courbes complètes pour tous les savons, nous avons, pour chaque savon, préparé un seul mélange : celui correspondant à la concentration optimale en savon. Ces concentrations optimales varient très peu, nous l'avons vu, suivant les savons ; nous avons cependant, pour chacun d'eux, utilisé la quantité rigoureusement correspondante à l'optimum expérimentalement déterminée par les essais précédents.

Il est évident que pour les acides saturés dont les savons sont trop peu solubles à pH 7,1 (stéarique, palmitique) et sur lesquels nous n'avons pas pu déterminer une concentration optimale, nous n'avons pas fait de détermination dans cet essai.

De plus, pour le sébacate de sodium, qui n'agit pratiquement pas, nous l'avons vu, et dont la faible action ne présente aucun optimum net, nous avons simplement opéré à une concentration moléculaire égale à la moyenne des concentrations optimales des autres savons.

Dans le tableau XI sont réunis les résultats que nous avons obtenus dans cette expérience.

Ces résultats nous ont permis de tracer les figures 22 et 23 dans lesquelles nous avons représenté l'activité de chaque savon à sa concentration optimale par un rectangle de hauteur proportionnelle à la quantité de substance extraite par l'éther (phosphatides pour la figure 22 et cholestérol total pour la figure 23).

TABLEAU XI.

Acides correspondant aux savons ajoutés en concentration optimale à 100 cm3 de sérum	Extrait éthéré total (mg)	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
Ricinoléique	865	1,64	75
Linoléique	596.5	1,43	70
Dibromostéarique	952	1,41	65
Oléique	810	1,23	59
Undécylénique	418	0,76	55
Undécylique	233	0,67	32
Sébacique	34	traces	4

Nous pouvons donc ainsi classer par ordre d'activités décroissantes les divers savons. Le ricinoléate de sodium se montre le plus actif ; ce fait doit être rapproché des constatations faites tout récemment par Valette et Cavier (111) au cours d'une étude sur le pouvoir dissolvant dans l'eau que présentent les solutions de savon vis à vis des lipides.

Valette et Cavier ont en effet constaté qu'à concentrations égales le ricinoléate était un meilleur dissolvant des lipides et du cholestérol que les autres savons. L'action que nous étudions semble pourtant, à première vue, être rigoureusement inverse de celle qu'étudient Valette et Cavier. Ces auteurs en effet étudient la dissolution des lipides dans l'eau par le savon ; nous étudions au contraire l'enlèvement de ces lipides à à leur solution aqueuse qu'est le sérum.

Comment se fait-il que pour deux actions aussi opposées, ce soit le même acide qui se montre le plus actif ? Ce fait, qui a priori parait paradoxal, peut être facilement interprété à la lumière des conceptions de Machebœuf et Sandor qui nous ont guidé dans nos recherches. D'après ces conceptions, les savons agissent en effet sur le sérum par leur pouvoir de se lier au chaines polyméthyléniques des protéides en prenant la place des lipides qui y étaient accolés ; or, se lier à des chaines

polyméthyléniques de protéides ou se lier à des chaines polyméthyléniques de lipides, n'est-ce pas un seul et même phénomène ?

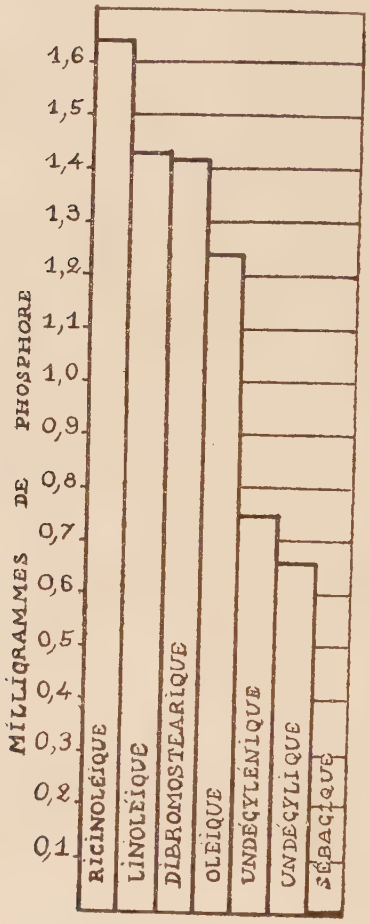


FIGURE 22

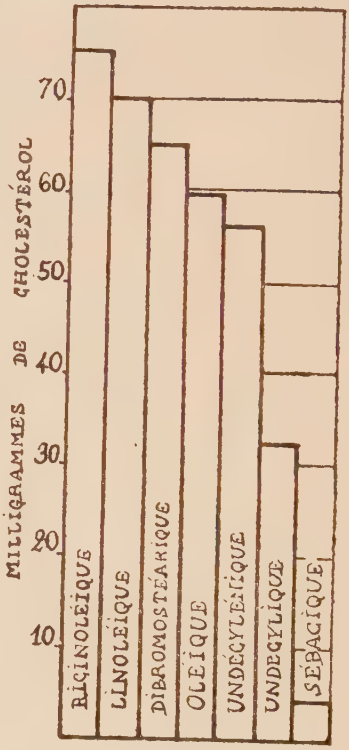


FIGURE 23

Il était donc à prévoir que le savon, qui se lie le mieux aux lipides pour les dissoudre dans l'eau, devait également être celui qui les détachait le mieux des protéides du sérum. Les expériences de VALETTE et CAVIER qui viennent d'être publiées (111)

alors que nos essais étaient effectués depuis longtemps déjà (*1*), nous apportent incidemment une excellente aide pour étayer l'hypothèse directrice qui constitue la base même de nos recherches.

Conclusions

Les divers acides gras, dont les savons sont suffisamment solubles et stables à pH 7,1, ont tous des activités très voisines sur le sérum en présence de l'éther.

Pour tous, l'optimum d'action correspond à peu près à une même concentration moléculaire.

Les quantités de lipides extraites par l'éther en présence des divers savons, lorsque la concentration en ces savons dans le sérum correspond à l'optimum, ne sont pas identiques ; on peut ranger les acides gras d'après la quantité de lipides extraits au sérum dans ces conditions optimales.

C'est l'acide ricinoléique qui est le plus actif, or on sait que c'est également le savon de cet acide qui se montre le meilleur dissolvant des lipides dans l'eau.

Ce rapprochement permet d'intéressantes déductions théoriques.

---

(1) Une partie de nos essais préliminaires avait même fait l'objet d'une note présentée à l'Académie des Sciences (72).

Influence du vieillissement du sérum sur l'extractibilité des lipides par l'éther en présence de savon.

B. Delage, (16) poursuivant les travaux de Machebœuf et Sandor (71) sur la délipidation du sérum à l'aide de l'éther alcoolisé, avait constaté que la quantité de substances lipoïdiques extraite dans ces conditions n'était pas la même sur un sérum frais que sur un sérum vieilli.

Cette remarque nous incita à étudier parallèlement l'action simultanée du savon et de l'éther sur un sérum frais et sur un sérum vieilli.

Nous avons utilisé à cet effet une solution d'undécylénate de sodium (à pH 7).

Pour cela, nous avons placé dans une série d'ampoules à décantation 20 cm^3 d'un sérum de cheval frais et des quantités croissantes de solution de savon. Puis, après agitation, nous avons ajouté dans chaque ampoule 20 cm^3 d'éther ; nous avons agité une dernière fois, puis après 6 jours de contact nous avons recueilli les phases éthérées que nous avons lavées, portées à l'évaporation, puis desséchées dans le vide jusqu'à poids constant.

Dans l'extrait éthéré ainsi obtenu, nous avons prélevé des parties aliquotes en vue d'effectuer les dosages du cholestérol total et du phosphore lipidique.

Nous avons effectué une opération identique en tous points sur un sérum de cheval recueilli aseptiquement et conservé en ampoules pendant huit mois à la glacière.

Le tableau N° 12 indique les résultats obtenus dans les deux cas.

Les résultats obtenus pour le phosphore lipidique et le cholestérol sont schématisés dans les courbes des figures N° 24 et 25.

TABLEAU XII.

	Grammes d'acide undécylénique ajoutés à l'état de savon à 100 cm3 de sérum	Cm3 d'undécylénate de sodium N/2,28 ajoutés à 100 cm3 de sérum	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
Sérum frais	0,993	12,3	0,36	1,3
	1,986	24,6	0,75	28
	3,972	49,2	0,50	32
	6,951	86,1	0,39	33
	9,930	123,0	0,34	56
Sérum vieilli (8 mois)	1,145	13,75	0	0
	2,290	27,50	0	8,5
	3,435	41,25	0	18
	8,015	96,25	0	29
	11,450	137,5	0	31

Nous ne donnons pas dans ce tableau les poids d'extrait éthéré total obtenus dans ces essais ; nous savons en effet que la majeure partie de cet extrait est constitué par l'acide gras du savon ajouté au sérum. Seul le passage dans l'éther des substances lipoïdiques du sérum présentait un intérêt pour nous.

De plus, nous avons avec intention tracé les courbes de ces deux essais sur un même schéma, bien qu'ils n'aient naturellement pas été effectués sur le sérum d'un même animal, mais nous verrons que, si l'on opère sur deux sérums frais provenant d'une même espèce animale, les résultats sont toujours très voisins.

Cette réunion des deux courbes sur un même schéma facilite la comparaison des résultats obtenus pour un sérum frais et pour un sérum conservé huit mois.

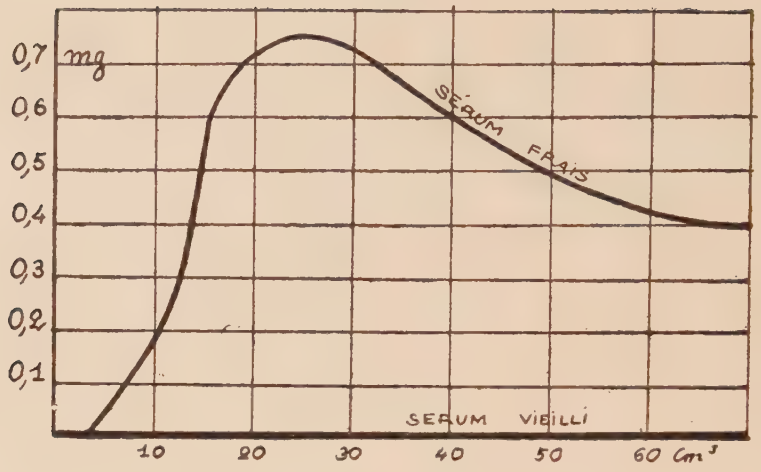


FIGURE 24

Courbes représentatives des variations du phosphore lipidique en fonction de la quantité d'undécylénate de sodium N/2,28, ajoutée à 100 cm3 de sérum.

Il est intéressant de constater que le savon et l'éther, qui sur un sérum frais peuvent extraire une notable quantité de phosphatides, ne peuvent plus en extraire si le sérum a été conservé longtemps.

Le phénomène est un peu moins net pour le cholestérol total, car sur le sérum vieilli (huit mois) l'action simultanée du savon et de l'éther permet encore l'extraction de cholestérol, mais en quantité nettement inférieure à celle que le même savon et l'éther sont capables d'extraire d'un sérum frais (figure 25).

Ces observations, qui démontrent l'augmentation de la stabilité des complexes lipidoprotéidiques avec le temps, sont en parfait accord avec les résultats obtenus par B. Delage. Une telle modification des propriétés du sérum en fonction de son vieillissement n'est pas surprenante, on sait en effet par exemple que la pression osmotique et le poids moléculaire des globulines varient avec la durée de conservation (95).

On sait aussi que certaines cénapses lipidoprotéidiques s'insolubilisent par simple vieillissement du sérum avec formation d'un précipité constitué par des protéides et des lipides (96). Il

n'est pas impossible, comme le pense Delage (16), que cette précipitation contribue à rompre l'équilibre normal du système lipidoprotéidique du sérum. Notons également que Delage (17) a constaté que certaines maladies provoquent une modification profonde de l'extractibilité des lipides sériques par l'éther alcoolisé. Ces maladies vieillissent en quelque sorte le sérum dans le sein même de l'animal : l'intérêt médical de ce fait est grand ; il serait intéressant d'étudier aussi les variations de la stabilité des cénapses lipidoprotéidiques vis à vis des savons dans divers états pathologiques, mais nous ne rapportons ici que nos essais sur des sérums d'animaux normaux.

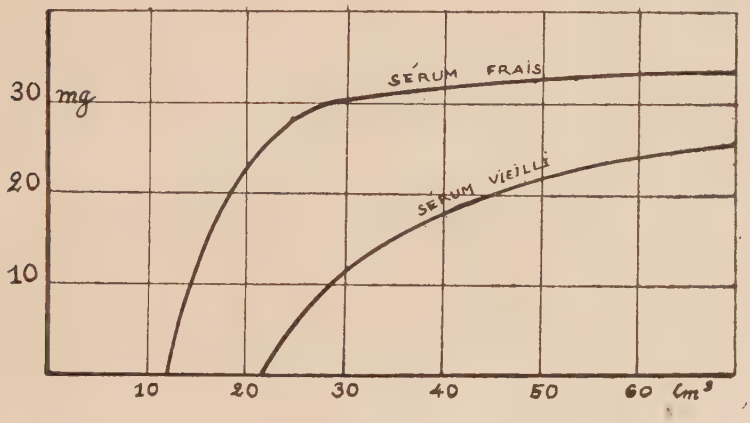


FIGURE 25

Courbes représentatives des variations du cholestérol total en fonction de la quantité d'undécylénate de sodium N/2,28, ajoutée à 100 cm3 de sérum.

Conclusions

Cet essai nous permet de confirmer qu'au cours du « vieillissement » du sérum le système lipidoprotéidique subit de profondes modifications qui provoquent de notables changements dans son comportement vis à vis des savons comme vis à vis des divers réactifs.

Essais comparatifs effectués sur les sérums de divers chevaux. — Quelques essais effectués sur des sérums humains et sur des sérums provenant de diverses espèces animales

Nous avons observé dans les précédents essais qu'il existait une concentration optimale en savon pour laquelle une quantité maxima de substances lipoïdiques pouvait être extraite par l'éther.

Il nous a semblé intéressant de rechercher si, pour un même savon, cette concentration optimale était la même pour divers sérums provenant d'une même espèce animale.

Sur deux sérums de chevaux différents, nous avons effectué à l'aide du dibromostéarate de potassium N/2,28 un essai identique à celui décrit précédemment.

Nous avons obtenu pour 100 cm^3 de sérum les résultats exposés dans le tableau N° 13.

Cet essai a été reproduit à plusieurs reprises sur des chevaux différents et chaque fois les courbes obtenues furent comme ici très comparables.

Le maximum correspond toujours à la même concentration en savon et pour cet optimum on constate seulement une légère variation dans la quantité des lipides extraits.

Nous avons voulu savoir si les phénomènes, que nous avons constatés pour du sérum de cheval, se manifestaient aussi pour des sérums provenant d'autres espèces de vertébrés.

Nous n'avons pas, pour la plupart de ces divers sérums, effectué des mesures aussi précises que pour le sérum de cheval, nous cherchions seulement à montrer la généralité des faits dans la série des vertébrés. Nous avons le plus souvent recherché simplement si l'addition d'oléate ou de dibromostéarate en quantités croissantes à du sérum provoquait bien l'apparition d'un précipité soluble dans l'éther et si cet éther dissolvait ain-

si du cholestérol. Nous avons cherché en outre si un excès de savon faisait bien diminuer l'intensité du précipité. Les essais furent positifs pour tous les sérums de vertébrés que nous avons étudiés : bœuf, mouton, porc, chien, lapin, cobaye et poule.

TABLEAU XIII

	Extrait éthéré total (mg)	Cm3 de solution de dibromostéarate de K N/2,28 ajoutée à 100 cm3 de sérum	Phosphore lipidique (mg)	Cholestérol total (mg)
Cheval N° 1	7,5	570	0,65	11
	15	735	0,97	65
	20	748	1,00	68
	30	715	0,72	58
Cheval N° 2	7,5	159	0,40	7,2
	15	872	1,05	70
	20	909	1,10	74
	30	731	0,88	62

N. B. — La durée du contact sérum-savon-éther a été de six jours.

Sur du sérum humain cependant, nous avons poussé nos investigations un peu plus avant : Nous avons étudié l'extrait éthéré total obtenu après avoir traité 20 cm³ de sérum humain normal par 3 cm³ de solution de dibromostéarate de potassium et 20 cm³ d'éther.

Cet extrait contenait pour 100 cm³ de sérum, 0,7 mg de phosphore lipidique, soit 18,2 mg de phosphatides et 164 mg de cholestérol. La quantité de cholestérol extraite de ce sérum

humain est bien supérieure à celle extraite des sérums de chevaux ; ceci n'est pas surprenant : on sait en effet que le sérum humain est bien plus riche en cholestérol que le sérum des autres mammifères (31).

Conclusions des essais comparatifs sur divers sérums d'une même espèce animale ou sur des sérums provenant d'espèces différentes.

Nous pouvons donc conclure que les faits que nous avons décrits pour le sérum de cheval doivent être généralisés aux autres espèces de mammifères et même aux oiseaux ; il est bien évident que seule l'allure générale des phénomènes est la même pour les diverses espèces animales étudiées, car les modalités varient assez nettement avec les espèces.

Pour une même espèce animale, les phénomènes sont toujours très semblables, de légères variations quantitatives différencient seulement les individus.

Conclusions générales du Chapitre III

L'extraction des lipides du sérum par l'éther en présence de savon évolue toujours d'une façon assez comparable, mais elle est influencée par de nombreux facteurs.

Nous avons étudié dans ce chapitre l'action des principaux facteurs : durée de contact entre l'éther et le sérum additionné de savon — pH de la solution de savon — pH du mélange sérum-savon — dilution par de l'eau du mélange sérum-savon — nature de l'acide gras du savon — durée de conservation du sérum depuis sa récolte jusqu'à son étude. Nous avons aussi étudié les différences individuelles que présentent entre eux les sérums de chevaux différents et nous avons élargi notre champ d'études par quelques essais sur des sérums humains puis sur des sérums provenant de diverses espèces animales.

CHAPITRE IV

Action des savons sur les cénapses lipidoproteidiques contenues dans les diverses fractions protéidiques du sérum.

Action des savons sur les cénapses lipido-protéidiques contenues dans les diverses fractions protéidiques du sérum

Nous avons vu que l'action simultanée des savons et de l'éther sur le sérum ne permet pas l'extraction totale des lipides sériques, même lorsque la concentration en savon est optimale.

Une certaine partie de ces lipides persiste donc au sein du sérum. Quelle est la fraction protéidique à laquelle ces lipides restent aussi solidement attachés ?

Pour étudier ce problème, notre premier soin fut de séparer d'un sérum les deux grandes fractions protéidiques : les *globulines* et les *albumines*, avant de les mettre en contact avec le savon et l'éther.

A cet effet, nous avons ajouté à 50 cm^3 de sérum de cheval, 50 cm^3 d'une solution saturée en sulfate d'ammonium préalablement neutralisée par de l'ammoniaque (pH 7).

Dans ces conditions, la totalité des globulines précipite ; nous les avons recueillies par centrifugation.

Afin d'enlever aux globulines les petites quantités d'albumines qui pouvaient les souiller, nous les avons remises en solution dans 15 cm^3 d'eau distillée, puis précipitées à nouveau par addition de 15 cm^3 de solution saturée en sulfate d'ammonium.

Les eaux mères, séparées des globulines lors de leurs deux précipitations successives, sont rassemblées ; elles contiennent les albumines qui, on le sait, sont solubles dans la solution demi-saturée en sulfate d'ammonium.

Action simultanée des savons et de l'éther sur la solution des globulines

Afin de pouvoir mieux suivre la destinée du savon employé, nous avons ici encore utilisé le dibromostéarate de potassium

dont l'acide gras n'existe pas dans le sérum sanguin et dont la caractérisation est facile, grâce à la réaction de DENIGÈS et CHELLE (18) qui permet de déceler le brome.

Les globulines (de 50 cm³ de sérum) sont dissoutes dans un volume d'eau distillée tel que la solution obtenue ait le même titre en globulines que le sérum dont on était parti (50 cm³ de solution).

Cette solution de globulines est additionnée de 10 cm³ de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 à pH 7,2 et de 50 cm³ d'éther.

On agite. Après six jours de contact, une partie de la phase aqueuse est prélevée en vue du dosage du cholestérol qui avait résisté à l'extraction par l'éther. Pour cela, nous avons coagulé les globulines par de l'alcool bouillant, puis nous les avons épuisées par de l'alcool chaud et enfin par de l'éther. Les solutions alcooliques et éthérées furent réunies et évaporées ; dans le résidu, nous avons dosé le cholestérol après saponification à chaud par de la potasse en solution dans l'alcool. Cette saponification avait pour but de décomposer les esters de cholestérol afin que nous puissions doser le cholestérol total. Après saponification, nous avons séparé par l'éther de pétrole « l'insaponifiable » sur lequel nous avons pratiqué la réaction colorée de LIEBERMANN ; nous fûmes alors fort surpris de constater que cette réaction pourtant si sensible fut entièrement négative.

L'action simultanée du savon et de l'éther sur les globulines a donc provoqué l'arrachement total du cholestérol que l'on retrouve d'ailleurs intégralement dans l'éther qui a été en contact avec le mélange globulines-savon.

Une conclusion importante découle déjà de cet essai :

Divers auteurs et surtout TROENSEGAARD et KOUDAHL (110) ont admis que le cholestérol était une partie intégrante de la molécule des globulines. Pour ces auteurs, les globulines seraient des hétéroprotéides dont le cholestérol constituerait le groupement prosthétique.

Or, nous constatons que le simple contact des globulines à froid avec de l'éther en présence d'un peu de savon leur fait perdre totalement leur cholestérol. Si le cholestérol était un

groupement prosthétique des globulines, il serait donc en tout cas bien faiblement lié au reste de la molécule ; on pouvait cependant penser encore que l'enlèvement du cholestérol par le savon suffisait à modifier profondément les propriétés des globulines et en particulier la propriété qui sert à les définir, c'est à dire leur insolubilité dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Nous avons constaté qu'il n'en est rien ; en effet, notre solution globulines-savon séparée de l'éther surnageant fut additionnée d'un égal volume de solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium et nous vîmes se former un considérable précipité.

Il se pouvait d'ailleurs que le savon qui s'était uni aux globulines à la place du cholestérol suffise à conférer à ces globulines leur insolubilité dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation. En effet, ce savon pouvait être considéré, en quelque sorte, comme un nouveau groupement prosthétique qui avait pris la place de l'ancien.

Aussi, avons nous cherché à enlever le savon pour voir si les globulines sans cholestérol et sans savon fixés à elles, présentaient encore la propriété caractéristique des globulines, c'est à dire leur insolubilité dans l'eau demi-saturée en sulfate d'ammonium.

Nous avons pour cela acidifié légèrement notre solution globulines-savon déjà épuisée par l'éther à pH 7,2 ; nous avons porté le pH vers 5 et nous avons à nouveau longuement épuisé le liquide par de nombreux lavages à l'éther.

Tout le savon fut ainsi pratiquement enlevé, car au pH auquel nous nous étions placé, le savon ne peut pas être stable ; il est décomposé avec libération de l'acide gras que l'éther enlève assez bien.

La solution de globulines ainsi obtenue ne contenait plus de cholestérol ; elle ne contenait plus que des traces d'acide gras et elle précipitait toujours abondamment lorsque du sulfate d'ammonium lui était ajouté en quantité correspondant à la demi-saturation.

Donc, un protéide peut être une globuline, c'est à dire être soluble dans les solutions salines neutres peu concentrées en sel et être insoluble dans la solution neutre de sulfate d'am-

monium demi-saturée, sans qu'il contienne du cholestérol ou un acide gras fixé à la place du cholestérol. Cette constatation infirme définitivement l'hypothèse de TROENSEGAARD et KOUDAHL

Nous venons de dire qu'à pH 5, l'éther enlève assez bien l'acide gras qui s'était fixé aux globulines à la place du cholestérol ; n'avons nous pas fait ici une pétition de principe en parlant de fixation de l'acide gras sur les globulines, puisque l'éther enlève du milieu acide cet acide gras comme s'il était libre ?

Il semble que non, car si l'on suit quantitativement cette extraction de l'acide gras par l'éther en milieu cependant acide (pH 5), on constate qu'elle n'évolue que très lentement et très difficilement jusqu'à l'enlèvement à peu près parfait de l'acide gras, or on sait que dans ces conditions et en l'absence de protéides, l'éther enlève, en quelques instants, la totalité de l'acide gras d'une solution de savon acidifiée à pH 5.

Nous devons admettre qu'il y a bien liaison entre de l'acide gras du savon et les protéides, mais que cette liaison n'est pas très stable et qu'en milieu nettement acide (pH 5) l'éther parvient à la longue à arracher à peu près complètement l'acide gras aux globulines.

Pour enlever totalement l'acide gras par agitation avec de l'éther de la solution acidifiée (pH 5), il faut des semaines de contact entre la solution et de l'éther fréquemment renouvelé.

Voici quelques uns des résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude quantitative de ce phénomène :

Nous avons ajouté à une solution de globulines de sérum de cheval la quantité optimale de solution de dibromostéarate de potassium à pH 7,2 et de l'éther. Après six jours de contact, l'éther fut enlevé, puis la solution aqueuse fut amenée à pH 5 et additionnée d'une nouvelle quantité d'éther qui fut renouvelée six fois en deux jours ; l'éther fut ensuite éliminé. A l'aide de soude diluée, le pH de la solution protéidique fut ramené à 7,2. Nous avons alors ajouté à la solution ainsi obtenue un volume égal de solution saturée en sulfate d'ammonium. Le précipité formé fut recueilli par centrifugation, dissous dans de l'eau, puis précipité une nouvelle fois à l'aide de sulfate

d'ammonium. Il fut enfin recueilli par centrifugation ; on constata qu'il contenait encore du brome en quantité notable ; de l'acide dibromostéarique s'était donc fixé aux globulines et l'éther n'avait pas pu l'en arracher même après six jours de contact à pH 7,2 et deux jours à pH 5.

Comme la réaction de DENIGÈS et CHELLE utilisée pour la recherche du brome est extrêmement sensible, nous nous sommes demandé si la quantité d'acide dibromostéarique qui restait ainsi fixée aux globulines était d'un ordre de grandeur comparable à la quantité de lipides désolvatés par le savon.

Pour cela, nous avons traité des globulines provenant de 20 cm^3 de sérum de cheval par 4 cm^3 de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 et par 20 cm^3 d'éther ; après six jours de contact, nous avons mis de côté l'éther et nous l'avons remplacé après avoir amené la solution à pH 5. Nous avons encore attendu deux jours, puis nous avons prélevé dans la solution une partie aliquote sur laquelle nous avons effectué un dosage de protéides et un dosage de substances lipoïdiques (lipides + acides gras) suivant la technique de KUMAGAWA et SUTO (59), qui nous a révélé que la solution globulinique (correspondant à 20 cm^3 de sérum) traitée par le savon et l'éther à pH 7, puis à pH 5 contenait :

Protéides	900 mg
Extrait lipoïdique	4,2 mg

Ce premier résultat, qui par la suite fut confirmé à plusieurs reprises, nous montre que la quantité d'acide gras, qui reste encore fixée aux globulines après ce traitement énergique par l'éther, est minime mais non négligeable ; pour la faire baisser notablement, il faut poursuivre plus longtemps encore le traitement par l'éther à pH 5.

Nous avons vérifié que les petites quantités de substances lipoïdiques, qui restaient ainsi encore collées aux globulines, étaient en majeure partie au moins de l'acide dibromostéarique ; pour cela, nous avons calciné en présence de soude les 4,2 mg que nous en possédions et nous avons pratiqué la réaction de DENIGÈS et CHELLE pour le brome qui fut fortement positive.

Notons que la quantité d'acide gras, qui reste ainsi encore accolée aux globulines après deux jours de contact avec l'éther (à pH 5), est faible par rapport à la quantité de lipides qui étaient primitivement fixés aux globulines. En effet, la quantité de globulines qui a servi à l'essai que nous rapportons ici contenait 72 mg de lipides et elle ne contient plus que 4,2 mg d'acides gras.

Si l'on poursuit plus longtemps l'action de l'éther sur le liquide acidifié (pH 5), on parvient à faire baisser encore la quantité d'acides gras qui reste dans les globulines et l'on obtient ainsi des globulines remarquablement privées de tout lipide et de toutes substances lipoïdiques.

Nous nous sommes basé sur ce fait pour établir une méthode de délipidation des globulines, car on sait l'intérêt que les biochimistes et en particulier les immunologistes portent à l'obtention de globulines sériques purifiées puisque c'est parmi ces globulines que se trouvent les anticorps des immunsérums ; or connaître la nature de ces anticorps est un des problèmes les plus captivants de l'immunité auquel s'attachent de nombreux chercheurs. Mais pour pouvoir aborder ce problème, il faut, avant tout, pouvoir purifier les globulines et en particulier les délipider sans les dénaturer.

Méthode permettant de délipider les globulines du sérum sanguin sans les dénaturer. (1)

Les résultats obtenus précédemment nous montrent que l'action simultanée des savons et de l'éther sur les globulines permet le « décollage » de la totalité des lipides, qui sont liés aux globulines ; il est possible d'autre part d'extraire secondaire-

(1) Cette technique, que nous avons mise au point en collaboration avec M. Macheboeuf, a déjà fait l'objet d'une note préliminaire à la Société de Biologie (73).

ment des globulines la presque totalité de l'acide gras correspondant au savon employé et qui s'était fixée sur les protéides à la place des lipides.

Les globulines, traitées convenablement par l'éther et le savon d'abord à pH 7, puis à pH 5, ne contiennent plus de lipides et seulement une infime quantité d'acide gras ; elles ne sont pas notablement dénaturées.

La délipidation des protéides en vue de leur étude physico-chimique ou immunologique est un problème fort complexe qui fut abordé bien des fois déjà. Toutes les fractions protéidiques que l'on peut isoler du sérum contiennent les lipides liés assez intimément aux protéides et dont l'arrachement peut difficilement se faire sans que les protéides subissent une dénaturation plus ou moins profonde. La seule technique qui permette, à notre connaissance, une délipidation à peu près totale des protéides du sérum sans amener une dénaturation notable de ces protéides est la technique de Hardy et Gardiner (42), qui nécessite l'emploi d'appareils permettant une série prolongée de lavages des protéides par l'alcool absolu à une température inférieure à — 5°. Ces lavages doivent être suivis de l'élimination parfaite de l'alcool par de l'éther refroidi puis d'une série d'épuisements avec de l'éther. Si cette technique est rigoureusement appliquée dans ses moindres détails, elle permet d'obtenir des protéides assez bien privés de lipides et qui ne semblent pas sensiblement dénaturés. La moindre erreur de technique, le moindre réchauffement des protéides avant leur complète deshydratation par l'alcool absolu refroidi ou même avant l'élimination totale de l'alcool par l'éther entraine des dénaturations notables. De plus, les nombreux épuisements par les solvants refroidis ne se font que lentement et avec grand peine, si l'on ne possède pas une centrifugeuse équipée pour le travail au dessous de — 5°. D'autre part, la deshydratation totale des protéides et l'action d'un réactif aussi énergique que l'alcool absolu ne sont peut être pas sans action sur certains détails de l'édifice fragile que sont les molécules si complexes des globulines sériques.

La méthode de Hardy et Gardiner a déjà cependant permis la réalisation de magnifiques travaux immunologiques dont nous ne prendrons pour exemple que les expériences de Linderstrom-Lang sur les anticorps des sérums antidiphtériques (65) et celles de Horsfall et Goodner sur les anticorps des sérums antipneumococciques (53).

Toute technique nouvelle, permettant une purification des globulines en diminuant les chances de modification de leur structure intime, peut être une aide souhaitable pour l'abord du grand problème de la nature des anticorps.

Les résultats exposés précédemment sur l'action simultanée des savons et de l'éther à pH 7, puis à pH 5, sur les solutions de globulines nous ont permis de mettre au point une technique permettant la délipidation des globulines n'utilisant aucun solvant alcoolique et de réalisation très aisée.

Les seuls réactifs utilisés sont :

1°) une solution d'un savon convenablement choisi et neutre (pH 7 à 7,3).

2°) de l'éther.

3°) une solution diluée d'un acide servant à faire varier légèrement le pH lorsque cela est nécessaire.

Notons que cette variation de pH est faible et qu'elle ne fait en somme que placer les globulines à un pH assez voisin de leur isoionique, donc dans des conditions qui semblent être les meilleures pour éviter leur dénaturation.

Technique :

1°) Les globulines séparées du sérum par la méthode habituelle (demi-saturation en sulfate d'ammonium) sont dissoutes dans de l'eau à une concentration égale à celle qu'elles avaient dans le sérum. La solution est placée dans une ampoule à décantation.

2°) On lui ajoute en agitant un neuvième de son volume d'une solution à 20 p. 100 de dibromostéarate de potassium, il apparait un volumineux précipité de substances lopoïdiques que le savon détache des protéides ; on ajoute un volume

d'éther à peu près égal à celui du liquide ; on agite très doucement l'ensemble puis on laisse en contact pendant quarante huit heures dans un endroit frais.

3°) On soutire le liquide aqueux, on lui ajoute progressivement, en agitant, la quantité d'acide sulfurique demi-normal nécessaire pour amener le pH vers 5,5 ; l'acide dibromostéarique est ainsi libéré de son savon, on l'extrait par de l'éther agité modérément avec la solution puis séparé par décantation après repos. On renouvelle le lavage à l'éther jusqu'à élimination totale de l'acide gras.

Après quatre lavages bien conduits (quatre journées) à l'éther à pH 5,5, l'élimination de l'acide gras est pratiquement totale. La solution de globulines obtenue ne contient plus que d'infimes traces de lipides, les globulines sont aussi bien délipidées que par la méthode de HARDY et GARDINER sans avoir subi l'action d'alcool, ni d'un réactif violent quelconque et sans avoir été deshydratées.

Pour certaines études immunologiques, il faut évidemment ramener le pH à celui du sérum.

Si l'on désire priver la solution de ses sels, on peut la soumettre à la dialyse.

Application de la technique de délipidation des globulines — Recherches sur les euglobulines.

On sait que les globulines peuvent être fractionnées en deux fractions principales :

1°) « euglobulines », solubles dans l'eau en présence de petites quantités de sels minéraux, mais insolubles dans l'eau distillée.

2°) « pseudoglobulines » solubles dans les solutions salines diluées et aussi dans l'eau distillée.

Si donc on soumet une solution de sérum globulines à la dialyse contre de l'eau distillée, l'élimination des sels provoque la précipitation des euglobulines tandis que les pseudoglobulines restent en solution.

Les deux fractions globuliniques que l'on sépare ainsi sont-elles bien différenciées ?

Le seul caractère de solubilité qui permette de les définir et de les séparer n'est-il pas conditionné par des impuretés absorbées et en particulier par des lipides accolés aux globulines ?

Cette question fut déja posée par d'autres auteurs dont nous discuterons plus loin les travaux ; nous avons cherché à y répondre en utilisant la technique de délipidation des globulines que nous venons de mettre au point.

Cette technique, en effet, ne fait intervenir aucun réactif violent capable de dénaturer notablement des globulines ; elle consiste essentiellement à additionner la solution des globulines d'un peu de savon en solution neutre, puis à agiter avec de l'éther d'abord en milieu neutre, puis en milieu très légèrement acidulé (pH 5). Aucune action d'alcool, aucune variation de pH éloignant les globulines de plus d'une unité pH de leur point isoélectrique, aucune élévation de température, aucune action en somme ne semble devoir modifier notablement les protéides eux-mêmes.

Que devenaient les euglobulines après ce traitement ?

Avaient-elles encore leur caractère fondamental qui est l'insolubilité dans l'eau distillée ?

Nous avons cherché à le savoir :

Nous avons délipidé des globulines par le savon et l'éther puis nous les avons soumises à la dialyse dans un dialyseur à membrane de collodion.

Dans un dialyseur identique, nous placé comme témoin une quantité égale des mêmes globulines non délipidées. Après trois jours de dialyse continue contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée, un résultat remarquablement net fut obtenu. Dans le dialyseur témoin qui contenait les globulines non délipidées, un énorme précipité d'euglobulines s'était formé. Dans le dialyseur qui contenait les globulines délipidées, il n'y avait plus qu'un infime précipité, donc la majeure partie des euglobulines avaient, par enlèvement des lipides, perdu son insolubilité dans l'eau distillée.

Pour bien montrer que c'était la délipidation par le savon et non la simple action de l'éther ou une influence dénaturante du séjour à pH 5 en présence d'éther qui modifiait les euglo-

bulines, nous avons fait une deuxième expérience dans laquelle les globulines témoin furent, elles aussi, traitées par l'éther à pH 7,1, puis à pH 5 mais sans savon.

Voici le protocole de cette expérience :

Nous avons préparé les globulines totales provenant de 150 cm³ de sérum de cheval ; nous avons divisé la solution de ces globulines (150 cm³) en deux parts égales qui furent placées dans deux ampoules à décantation semblables.

Dans l'une des ampoules, nous avons ajouté en agitant 7,5 cm³ de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28, dont le pH était 7,2. Nous avons ensuite versé dans chacune des ampoules 75 cm³ d'éther et nous avons agité pareillement les deux ampoules que nous avons ensuite laissées en repos pendant quarante huit heures. Nous avons alors retiré l'éther, qui s'était rassemblé en surface, et nous l'avons remplacé par une quantité égale d'éther pur. Nous avons agité et laissé en contact jusqu'au lendemain. L'éther fut renouvelé deux fois encore. Le sixième jour, les phases aqueuses furent l'une et l'autre amenées à pH 5 et agitées avec de l'éther qui fut renouvelé trois fois en quarante huit heures. Les solutions de globulines ainsi traitées furent ramenées à pH 7 puis placées dans des dialyseurs en collodion qui furent plongés dans de l'eau distillée maintenue à + 4° et fréquemment renouvelée. Après cinq jours, nous avons recueilli les précipités formés qui représentaient les protéides insolubilisés par le départ des sels. Le précipité était six fois plus abondant environ dans le dialyseur qui contenait les globulines non délipidées. Pour préciser ce résultat, nous avons dosé dans les précipités les protéides et aussi les substances lipoïdiques.

Nous avons reproduit cet essai sur deux sérums de chevaux différents ; nos résultats furent les suivants :

Premier sérum : Le précipité formé par dialyse contenait : sans action du savon, 311 mg de protéides et 13 mg de substances lipoïdiques ; après action du savon, il ne contenait plus que 66 mg de protéides et 3 mg de substances lipoïdiques.

Deuxième sérum : Sans action du savon : 283 mg de protéides et 19 mg de lipides. Après action du savon, 63 mg de protéides et 5 mg de substances lipoïdiques.

Ces résultats sont fort probants. Près des quatre cinquièmes des globulines qui précipitent par dialyse, lorsque les globulines ne sont pas délipidées, restent au contraire en solution dans l'eau distillée lorsque le savon leur a arraché leurs lipides.

La majeure partie de ce que l'on considère donc comme des « euglobulines » ne doit le caractère d'insolubilité dans l'eau qui sert à les définir qu'à la présence de lipides qui leur sont liés.

Ces « euglobulines », qui perdent leur caractère d'euglobulines par délipidation sont donc des cénapses lipidoprotéidiques à solubilité spéciale et non une fraction protéidique particulière. La définition même du terme « euglobulines » est à réviser. Des essais ultérieurs viendront, nous l'espérons, préciser la nature des protéides qui, en s'unissant ainsi à des lipides, acquièrent la propriété d'être insolubles dans l'eau distillée.

Ce fait avait été soupçonné, il y a longtemps déja, par divers auteurs parmi lesquel il faut citer Hardy (41), Nerking (81), Chick (11 , Marcus (77), Handowski et Wagner (39), Hammarsten (37), Jarisch (55), Samuely (97) etc...

Les conceptions de ces auteurs ont été vivement critiquées récemment par Sandor (98), qui prétend que l'insolubilité des euglobulines dans l'eau ne peut pas être mise sur le compte des graisses qui précipitent avec cette fraction.

Pour conclure ainsi, Sandor se base simplement sur le fait que les euglobulines (insolubles dans l'eau distillée) et les pseudoglobulines (solubles dans l'eau distillée) contiennent les unes et les autres des lipides en proportions à peu près égales.

Sandor n'a pas cherché à délipider ces globulines, mais il croit pouvoir affirmer qu'étant donné que les unes et les autres contiennent des lipides, ces lipides n'ont rien à voir avec la solubilité qui les différencie.

Nos résultats sont formellement opposés à la conclusion trop hâtive de Sandor.

Il faut admettre que les lipides des pseudoglobulines sont liés aux protéides d'une manière différente de celle qui lie les lipides des euglobulines ou bien penser que les protéides liés

aux lipides ne sont pas les mêmes dans les euglobulines et dans les pseudoglobulines.

La simple étude des teneurs en lipides ne suffit pas à permettre une conclusion telle que celle de SANDOR.

Un fait est certain : si l'on délipide les euglobulines, on enlève à la majeure partie d'entre elles la propriété de précipiter par dialyse.

Conclusions de l'étude sur les globulines.

L'action simultanée de certains savons et de l'éther sur les globulines sériques provoque la délipidation totale de ces globulines.

Le savon se fixe aux protéides à la place des lipides en formant des cénapses globulines-acides gras, décomposables en majeure partie à pH 5 par agitation avec de l'éther.

Ces constatations permettent de mettre au point une méthode simple permettant de délipider presque totalement les globulines sans les dénaturer notablement.

La solution de globulines délipidée par le savon et l'éther (à pH 7 puis à pH 5), puis soumise à la dialyse, ne laisse plus précipiter que de très petites quantités de protéides.

La majeure partie de la fraction que l'on qualifie du terme « euglobulines » ne doit donc son insolubilité dans l'eau en l'absence de sels qu'aux lipides qui sont unis aux protéides de cette fraction.

Action simultanée du savon et de l'éther sur les albumines.

Pour obtenir les albumines que nous voulions étudier nous avons utilisé la technique de MACHEBŒUF.

La solution des albumines sériques de 50 cm³ de sérum de cheval séparée des globulines comme nous l'avons vu ci-dessus, est additionnée de 10 cm³ de solution saturée en sulfate d'ammonium ; à l'aide d'acide sulfurique N/5, on amène le pH vers 3,9. De cette façon (69), on précipite la totalité des albumines que l'on recueille par centrifugation après avoir vérifié que les eaux mères ne contiennent plus de protéides.

Le précipité d'albumines est mis en suspension dans un peu d'eau distillée ; on ajoute la très petite quantité d'ammoniaque diluée pour ramener le pH à 7 ; tout se dissout, on complète alors le volume à 50 cm³.

La solution albumineuse ainsi obtenue est placée dans une ampoule à décantation. On l'additionne de 5 cm³ de solution de dibromostéarate de potassium N/2,28 et de 50 cm³ d'éther. Après six jours de contact, l'éther, qui contient une notable quantité de cholestérol, est éliminé. A l'aide d'acide sulfurique N/5, on amène le pH de la solution vers 5, de façon à libérer l'acide gras formant le savon ; on ajoute 50 cm³ d'éther et l'on agite. Quand l'éther surnageant a été renouvelé un certain nombre de fois et quand la durée de contact a été jugée suffisante (4 jours), on prélève une partie de la solution aqueuse albuminique.

On constate alors que les protéides de cette solution précipitent quantitativement par la solution de sulfate d'ammonium, quand le pH est amené aux environs de 4, comme avant délipidation.

Le précipité obtenu dans ces conditions peut être remis en suspension dans l'eau distillée et s'y dissout en formant une

solution limpide si le pH est amené aux environs de 7. Les albumines ont donc conservé leurs caractères de solubilité.

La solution d'albumine ainsi traitée ne contient pas du tout de brome et renferme encore de très notables quantités de cholestérol et de phosphatides.

Conclusions des essais sur les albumines.

Contrairement à ce que nous avons vu pour les globulines, l'action simultanée du savon et de l'éther n'enlève pas aux albumines la totalité du cholestérol ni des lipides.

Une forte proportion de ces substances lipoïdiques est bien arrachée aux albumines par le savon, mais il en reste une assez notable partie.

Si, secondairement, on porte le pH à 5, puis si l'on soumet encore le liquide à l'action de l'éther, on enlève très bien le savon, mais on n'enlève pas davantage les lipides que n'avait pas décollé le savon.

Quels sont donc les lipides aux caractères si spéciaux qui dans les albumines résistent à l'action du savon et de l'éther, même après acidification ?

Nous avons cherché si ce n'étaient pas les lipides constitutifs des cénapses acidoprécipitables aux propriétés si curieuses dont Machebœuf a pu montrer l'existence dans les albumines du sérum (69).

Action simultanée des savons et de l'éther sur les cénapses acidoprécipitables de Machebœuf.

(ou pour abréger C. A. M.)

La fraction C.A.M. de 100 cm³ de sérum de cheval est dissoute dans 25 cm³ d'eau distillée, si bien que la solution obtenue est quatre fois plus concentrée en C.A.M. que le sérum dont on était parti.

Si à 2 cm³ de cette solution, on ajoute goutte à goutte en agitant la solution de dibromostéarate de potassium, il n'apparait aucun précipité, quelle que soit la quantité de savon.

Le savon sans éther semble donc être sans action sur les lipides que contient en abondance le C.A.M.

Vingt autres centimètres cubes de cette solution sont placés dans une ampoule à décantation et additionnés de 2 cm³ de la solution de dibromostéarate de potassium N/2,28.

Après avoir ajouté de l'éther (20 cm³), on ajoute et on laisse en repos six jours.

On opère alors sur les deux phases un dosage de phosphore et un dosage de cholestérol total qui donnent les résultats suivants :

Phase aqueuse.

Phosphore	2,4 mg
Cholestérol	31,2 mg

Phase éthérée.

Phosphore	0,1 mg
Cholestérol	2 mg

La préparation de cénapses acidoprécipitables de Machebœuf ne nécessite pas obligatoirement la longue série de purifications que comporte la méthode originale. Le C.A.M. peut encore être obtenu par la technique simplifiée de Machebœuf et Januszkiewicz (70), qui a été utilisée dans l'expérience que nous rapportons ici.

Il est probable que les très petites quantités de cholestérol et de phosphatides que nous avons pu arracher par le savon et l'éther correspondaient à des impuretés que n'avait pas éliminées complètement la technique simplifiée d'obtention des C.A.M., que nous avons utilisée. Les cénapses acidoprécipitables de Machebœuf sont donc insensibles à l'action du savon et de l'éther.

Conclusion des essais sur les cénapses acidoprécipitables de MACHEBŒUF.

L'éther et les savons sont sans action sur les cénapses acidoprécipitables de MACHEBŒUF.

L'addition de savon à la solution de ces cénapses ne produit aucun trouble et l'éther agité avec le mélange savonneux n'en extrait pas le cholestérol ni les lipides.

Conclusions d'ensemble du chapitre IV au sujet de l'action des savons et de l'éther sur les diverses fractions protéidiques du sérum.

Le sérum sanguin contient des cénapses lipidoprotéidiques très diverses et de stabilité fort différentes.

1°) Les cénapses qui font partie de la fraction appelée « globulines » sont toutes détruites par les savons qui en déplacent les lipides.

2°) Parmi les cénapses qui font partie de la fraction appelée « albumines », la majeure partie est également détruite par le savon, mais les cénapses acidoprécipitables dont MACHEBŒUF a autrefois montré l'existence dans les albumines sont beaucoup plus stables et l'action combinée du savon et de l'éther ne leur arrache pas les lipides qui s'y trouvent cependant en proportion considérable.

DELAGE (17), en étudiant la stabilité des cénapses du sérum par la technique de MACHEBŒUF et SANDOR, a aussi constaté une différence de stabilité entre les cénapses contenues dans les diverses fractions protéidiques.

Ses résultats confirment la remarquable stabilité des cénapses acidoprécipitables de MACHEBŒUF, mais d'autre part, DELAGE constate que les cénapses des globulines résistent mieux à l'action de l'éther alcoolisé que celles des albumines.

L'éther alcoolisé qu'utilise Delage n'enlève qu'une faible partie des lipides du sérum (50 p. 100 environ), le savon que nous étudions en enlève 80 à 90 p. 100. Le savon peut détruire toutes les cénapses lipidoprotéidiques autres que les cénapses acidoprécipitables de Machebœuf et, comme ces cénapses se trouvent dans les albumines, ceci explique la contradiction apparente entre les résultats de Delage et les nôtres.

La stabilité si particulière des cénapses acidoprécipitables de Machebœuf conduit à admettre que, dans ces cénapses, les lipides sont liés aux protéides d'une façon très particulière. Ce ne doit pas être une simple solvatation de chaines polyméthyléniques qui pour eux est responsable de l'accolement des lipides aux protéides. Pour ces cénapses, on doit penser à une union plus intime, peut être à une combinaison chimique entre protéides et lipides.

CHAPITRE V

Etude d'une petite fraction insoluble dans l'éther du précipité formé lors de l'addition d'un excès de savon et d'éther à du sérum sanguin.

Etude d'une petite fraction insoluble dans l'éther du précipité formé lors de l'addition d'un excés de savon et d'éther à du sérum sanguin.

En décrivant dans les chapitres ci-dessus les phénomènes constatés lors du traitement du sérum par du savon et de l'éther, nous avons volontairement négligé un fait qui, d'ailleurs, peut paraître à première vue assez secondaire ; lorsque la quantité de savon ajoutée au sérum est assez élevée et est au moins proche de l'optimum, on constate que le précipité apparu ne se dissout pas intégralement dans l'éther ; il reste un très léger louche qui se rassemble dans les jours suivants en une très mince couche de précipité blanc entre l'éther et le sérum. On pourrait croire qu'il s'agit d'une très petite quantité d'émulsion ne se brisant pas par le repos ; il n'en est rien car, si l'on recueille cette matière par centrifugation, puis qu'on la lave par agitation avec de l'éther et de l'eau (*1*), on constate que le résidu insoluble est microcristallin.

Quelle est cette substance, insoluble dans l'eau et l'éther, qui précipite ainsi en très petites quantités par addition d'une forte quantité de savon et qui ne précipite pas si la quantité de savon est moindre ?

Nous avons cherché à analyser cette substance, mais comme nous n'en possédions que d'infimes quantités, nous avons dû mettre en œuvre les techniques microanalytiques les plus précises.

Nous avons tout d'abord vérifié que la substance était organique, mais ne contenait ni azote, ni phosphore, ni soufre.

(1) Eau salée à 9 p. 1.000 d'abord, puis distillée ensuite afin que les euglobulines qui peuvent provenir du sérum ne précipitent pas par contact avec de d'eau distillée.

Par microcalcination dans un creuset en platine taré à la microbalance, nous constatons que 1,884 mg de la substance sèche laisse 0,190 mg de cendres ; ces cendres sont très fortement alcalines, car, par addition d'une gouttelette de solution de phénolsulfone phtaléine, on obtient une forte teinte rouge (pH supérieur à 8,9).

Nous avons ajouté une très petite quantité d'acide sulfurique dilué de manière à acidifier franchement, puis nous avons évaporé l'eau et chassé l'acide sulfurique en excès par un rapide chauffage à feu nu, sans porter au rouge.

Dans ces conditions, tout devait être à l'état de sulfates et nous avons à nouveau pesé le résidu contenu dans la capsule. Le poids en était : 0,428 mg. Les sulfates ainsi obtenus sont pratiquement insolubles dans quelques gouttes d'eau ; il ne s'agit donc pas de sulfate de sodium ou de potassium.

Pour savoir quels étaient les cations de ces sulfates, nous en avons fait l'analyse spectrographique au moyen d'un spectrographe de Féry *(1)*. L'examen du spectogramme nous a révélé que le seul cation présent était du calcium. Toutes les raies du spectre de cet élément furent identifiées et nous ne trouvâmes en outre que quelques faibles raies limites du platine provenant évidemment de la capsule où furent effectués la microcalcination et le traitement des cendres par l'acide sulfurique.

Sachant ainsi quel était le métal qui entrait dans la constitution de la substance étudiée, nous avons pensé que nous devions avoir affaire à un sel de calcium d'acide organique.

La teneur en calcium, que nous avait permis de déduire notre expérience de microcalcination, et la pesée des cendres sulfatées nous permettaient de connaître au moins approximativement le poids moléculaire de l'acide de ce sel de calcium :

Le sulfate de calcium (SO^4Ca) a pour poids moléculaire 136 ; la masse moléculaire de notre substance à l'état de sel de calcium est donc :

$$M = \frac{1,884}{0,428} \times 136 = 599$$

(1) Baudouin, constructeur.

Le poids atomique du calcium étant 40 et le calcium étant divalent, la masse d'un équivalent acide de l'acide gras qui est combiné au calcium doit être :

$$\frac{599 - 40}{2} = 280 \text{ environ}$$

Or, l'acide oléique qui nous avait servi pour préparer le savon ajouté au sérum dans l'essai envisagé ici a pour poids moléculaire 284 ; on ne pouvait pas espérer meilleure concordance avec notre résultat expérimental. Il était donc dès lors vraisemblable que le petit précipité insoluble dans l'éther que nous analysions était de l'oléate de calcium.

Pour le vérifier, nous en avons repris une très petite fraction, (2 milligr.), nous avons constaté qu'en la traitant par un peu d'eau acidulée à l'aide d'acide chlorhydrique et par de l'éther, tout se dissolvait ; l'eau contenait du chlorure de calcium et l'éther contenait bien un acide organique. Nous avons vérifié qu'il s'agissait bien d'un acide non saturé en évaporant l'éther sous un courant d'azote et en reprenant le petit résidu par 1 cm^3 de chloroforme, puis en ajoutant goutte à goutte une solution chloroformique diluée de brome jusqu'à coloration jaune paille persistante ; il nous fallut sept gouttes de notre solution de brome pour cela, tandis qu'une seule goutte donnait la même teinte pour un poids égal de chloroforme utilisé comme témoin. Notre acide gras est bien un acide non saturé puisqu'il fixe du brome par simple addition à froid.

Nous avons, pour mieux démontrer encore que l'acide du sel de calcium était bien celui du savon ajouté au sérum, utilisé un procédé indirect :

Nous avons reproduit cet essai avec, comme savon, le dibromostéarate de sodium ; nous avons séparé le petit précipité de sel de calcium ; nous l'avons soigneusement lavé à l'éther et à l'eau, puis nous y avons recherché le brome par la réaction de Denigès et Chelle après carbonisation en présence de potasse. La réaction fut fortement positive ; ceci prouve bien que l'acide dibromostéarique prend part à la formation du précipité calcique analysé.

Un point fort intéressant est à considérer, maintenant que nous savons que le précipité insoluble dans l'eau et dans l'éther est un savon de calcium :

Comment se fait-il que ce précipité n'apparaisse que pour des concentrations en savons assez élevées et pas pour des concentrations moindres qui, cependant, sont très supérieures à celles que l'on pourrait croire suffisantes pour précipiter à l'état de savon la faible quantité de calcium que contient le sérum ?

Dans le sérum, il y a environ 100 milligrammes de calcium par litre ; si ce calcium était simplement en solution à l'état de sel dans l'eau, il suffisait d'ajouter à la solution une goutte de nos solutions de savon, qui sont très concentrées, pour voir apparaître un fort précipité de savon de calcium. Or, nous avons déjà dit que, lorsque, par exemple, à 20 cm^3 seulement de sérum, on ajoute 0,25 cm^3 d'une solution à 20 p. 100 d'oléate de sodium, il n'apparait pas de précipité, le mélange reste limpide ; il y a cependant 59 mg de savon en présence de 2 mg d'ions calcium, soit un excès de savon.

Bien plus, si la quantité de savon est double (0,50 cm^3 de solution à 21 p. 100), tout le précipité qui se forme au moment du mélange du savon avec le sérum, est entièrement soluble dans l'éther ; il ne s'est donc pas formé de précipité de savon de calcium ; le savon est cependant en considérable excès par rapport aux ions calcium.

Il faut que la quantité de savon soit encore deux fois plus élevée (1 cm^3), c'est-à-dire voisine de l'optimum en ce qui concerne l'arrachement des lipides au sérum, pour que le précipité d'oléate de calcium se forme. Or, on sait qu'en absence de sérum, l'oléate de calcium précipite quantitativement lorsque l'on mélange une solution d'oléate de sodium à une solution d'ions calcium dans les conditions où nous sommes placé ici, dès qu'il y a assez de savon pour correspondre à la quantité de calcium présent.

Pour expliquer ce fait, on est obligé d'admettre que l'acide gras du savon se combine à d'autres constituants du sérum avant de s'unir au calcium pour former le sel de calcium insoluble. Il faut que l'affinité de l'acide gras pour les protéides

soit vraiment considérable pour l'empêcher de former avec le calcium un composé aussi insoluble que son sel de calcium, qui, d'ailleurs, se forme parfaitement lorsqu'il y a un peu plus de savon, c'est-à-dire lorsque le savon est en excès par rapport à ce que peuvent en fixer les protéides et les lipides du sérum.

Ces faits constituent donc un nouvel argument en faveur de ce que nous avons déjà avancé, à savoir l'union des acides gras en cénapses avec les protéides. Si, en effet, l'acide gras s'unit aux protéides pour former des complexes hydrosolubles (cénapses) en déplaçant les lipides qui étaient unis aux protéides, ce ne sera que lorsque le savon sera en excès par rapport à la capacité de fixation des protéides que ce savon en excès, libre de tout complexe, pourra se combiner au calcium pour former un sel insoluble.

Ici encore, nous devons distinguer trois zônes de concentrations distinctes, lorsque nous faisons progressivement croître la quantité de savon ajoutée au sérum :

1°) Pour une faible quantité de savon, il n'apparait aucun précipité lipidique, ni aucun précipité calcique, tout le savon ajouté trouve des protéides libres pour s'unir à eux sans avoir à déplacer de lipides et sans pouvoir s'unir au calcium.

2°) Pour une plus forte proportion de savon, ce dernier doit pour s'unir aux protéides déplacer les lipides qui leur étaient unis et qui précipitent. Le calcium, ne trouvant pas encore d'acide gras non uni à des protéides, ne peut pas encore former de sel de calcium insoluble.

3°) Lorsque la proportion de savon est suffisante, un excès de ce savon ne trouve plus de protéides pour s'unir à eux ; il peut alors réagir avec les ions calcium pour former un sel de calcium insoluble.

Il est bien évident que la précipitation du calcium à l'état de sel d'acides gras, dans les conditions où nous nous sommes placé, pourrait être utilisée pour établir une méthode de dosage du calcium dans le sérum ; ceci fera, pensons nous, l'objet d'un travail ultérieur, car le dosage précis du calcium dans le sang de certains malades est un problème fort délicat dont la solution intéresse vivement les médecins.

Conclusions du chapitre V

Lorsque le savon ajouté au sérum est en quantité assez grande, le calcium du sérum forme avec l'acide gras du savon un sel qui est insoluble dans l'eau et dans l'éther et qui se rassemble en un très léger précipité surmontant le sérum à la limite entre le sérum et l'éther. Les modalités d'apparition de ce savon de calcium permettent d'intéressantes déductions théoriques, qui étayent une fois encore l'hypothèse directrice de notre travail au sujet de l'action du savon sur les cénapses lipidoprotéidiques du sérum.

CHAPITRE VI

Recherches immunochimiques effectuées comme application des recherches précédentes sur l'action du savon sur le sérum sanguin

Recherches immunochimiques effectuées comme application des recherches précédentes sur l'action des savons sur le sérum sanguin.

Nous avons vu que le savon en présence d'éther arrache au sérum tous les lipides autres que ceux des cénapses acidoprécipitables de Machebœuf et s'accole aux protéides à la place des lipides.

Nous avons cherché à savoir :

1°) Si l'enlèvement de ces lipides ne fait pas perdre aux protéides certaines de leurs propriétés immunologiques et, en particulier, leur pouvoir de sensibilisation anaphylactique.

2°) Si l'accolement aux protéides d'un savon à la place des lipides ne modifie pas leur spécificité immunologique et ne leur confère pas, par exemple, une nouvelle spécificité.

On sait, en effet, que les propriétés antigéniques des protéides et tout particulièrement leur spécifité peuvent dépendre de molécules non protéidiques ou de simples fonctions chimiques soudées à ces protéides (travaux de Landsteiner et de son école (60)).

Il aurait donc pu se faire que certaines des propriétés antigéniques des protéides du sérum soient sous la dépendance des lipides unis en cénapses aux protéides du sérum.

Dans un premier essai, nous avons cherché si le pouvoir de sensibiliser anaphylactiquement le cobaye persistait encore après action du savon sur le sérum :

Un sérum de cheval fut soumis à l'action simultanée du dibromostéarate de potassium et de l'éther (à pH 7,2).

Le sérum ainsi partiellement délipidé contient, nous l'avons vu, des cénapses formées par l'union des protéides et du savon utilisé.

Ce sérum fut injecté à des cobayes. Nous avons divisé ces animaux en trois séries :

Ceux de la 1re série reçurent 0,2 cm³ du liquide
Ceux de la 2e série reçurent 0,4 cm³ du liquide
Ceux de la 3e série reçurent 0,6 cm³ du liquide

Quatre semaines plus tard, nous avons injecté dans le cœur de certains de ces animaux de chaque série, 0,3 cm³ de sérum de cheval non traité par le savon ; ces animaux sont morts en quelques instants en présentant un choc anaphylactique typique.

Donc, l'enlèvement des lipides par le savon au sérum, qui nous avait servi à sensibiliser les animaux, n'avait pas fait disparaître la propriété sensibilisante de ce sérum.

Un autre lot de ces animaux, reçut comme injection déchaînante, du sérum également traité par le savon et l'éther, ces animaux moururent également en présentant un choc anaphylactique typique ; donc l'action du savon et de l'éther n'a pas enlevé au sérum la propriété de déclencher la crise anaphylactique chez des animaux sensibilisés.

La spécifité anaphylactique du sérum de cheval persiste, en somme, après l'action du savon et de l'éther ; il se pouvait cependant encore qu'à cette spécifité se soit surajoutée un nouveau caractère spécifique du fait de modifications des protéides par action du savon et de l'éther, mais pour montrer ce fait, il fallait sensibiliser l'animal avec un sérum de cheval savonné, puis essayer de déclancher le choc anaphylactique par du sérum d'une autre espèce animale, le porc par exemple, également traité par le savon et l'éther. Si le savon et l'éther faisaient en effet, par modification des protéides, apparaître une nouvelle spécifité, cette spécifité devait être la même pour tous les protéides de sérums de mammifères soumis à l'action du savon et de l'éther. Or, il nous fallait pour la mettre en évidence éliminer l'action déchaînante du sérum lui-même. Ceci n'était possible qu'en utilisant, pour le déclanchement du choc, un sérum d'une espèce animale différente de l'espèce qui avait servi à la sensibilisation. Nous avons donc pris un troisième lot de nos cobayes qui avaient été sensibilisés un mois auparavant au moyen de sérum de cheval traité par le savon et nous leur avons injecté du sérum de porc traité de la même façon par le dibromostéarate de potassium et

l'éther. Aucun des trois animaux soumis à cet essai n'a présenté le moindre symptome anaphylactique et cependant, ils étaient bien sensibilisés puisqu'ils sont ensuite tous morts en quelques instants lorsque, pour vérification, nous leur avons injecté dans le cœur, quelques heures plus tard, 0,3 cm^3 de sérum de cheval.

Conclusions des essais sur l'anaphylaxie.

1° Le traitement du sérum de cheval par le dibromostéarate de potassium et l'éther ne modifie pas le pouvoir sensibilisant du sérum.

2°) Il n'apparait aucun pouvoir sensibilisant nouveau dans un sérum traité par le dibromostéarate de potassium, vis-à-vis d'un sérum d'espèce différente traité par le même savon.

Nous avons étendu ces recherches immunologiques en cherchant si l'action du savon et de l'éther ne faisait pas apparaitre par modification des protéides une modification quelconque décelable par un moyen immunologique autre que par l'anaphylaxie.

Nous avons immunisé des lapins par une série d'injections bi-hebdomadaires de sérum de cheval traité au préalable par le dibromostéarate et l'éther, puis, après quatre semaines, nous avons saigné ces animaux afin de rechercher si leur sang contenait des anticorps autres que ceux que l'on pouvait rencontrer dans les mêmes conditions lorsque l'on injecte du sérum de cheval non traité par le savon.

Nous avons recherché s'il n'apparaissait pas une précipitine capable de réagir avec des protéides semblablement traités par le savon et l'éther, mais provenant d'un sérum d'un animal d'espèce différente (cobaye) de celle qui nous avait servi à immuniser les lapins.

Nous n'avons pas pu constater la moindre précipitation dans ces conditions.

La sensibilité de tels essais sérologiques est, on le sait, considérable et si une modification profonde des protéides avait été apportée par le savon et l'éther à une proportion même infime des protéides, une spécifité nouvelle serait apparue, spécifité que nous aurions pu facilement mettre en évidence.

Nos résultats constituent donc non seulement une preuve de l'inactivité des lipides enlevés par le savon dans la détermination de la spécifité antigénique des protéides, mais encore un argument très puissant pour faire admettre que l'action simultanée du savon et de l'éther sur les protéides n'apporte à ces protéides aucune dénaturation profonde, ni aucun modification chimique importante.

Notons également que le fait de lier au protéide un acide gras qui, comme l'acide dibromostéarique, n'existe pas dans l'organisme du lapin ne confère pas à ces protéides une spécificité antigénique nouvelle, car le sérum de lapins immunisés avec du sérum de cheval traité par le dibromostéarate de potassium ne réagit pas (précipitines) avec du sérum de porc également traité par du dibromostérate. Ce fait pourrait paraître surprenant, puisqu'en somme nous avions injecté au lapin un antigène constitué par des protéides de cheval liés à une substance étrangère à l'organisme du lapin (acide dibromostéarique), mais on sait par les travaux de l'école de LANDSTEINER que les groupements chimiques apolaires tels que les bromes des dérivés halogénés n'ont, sur la spécifité antigénique, qu'une influence très secondaire. L'acide dibromostéarique ne diffère pas assez de l'acide oléique ou de l'acide stéarique que contient l'organisme du lapin pour que les cénapses protéides-acide dibromostéarique soient des antigènes présentant une spécifité en rapport avec l'acide dibromostéarique.

Si nous pouvions utiliser, pour décoller les lipides du sérum et s'accoler aux protéides à leur place, le savon d'un acide gras différant des acides de l'organisme du lapin par l'existence de fonctions polaires, nous pourrions probablement constater l'apparition dans le mélange sérum-savon d'une spécifité antigénique nouvelle dont le déterminant serait l'acide gras du savon, mais nous avons vu que l'acide sébacique, diacide que nous avions étudié dans ce but, ne délipide pas les protéides du sérum.

Des essais dans ce sens pourraient être entrepris avec des acides synthétiques possédant par exemple un cycle benzénique porteur d'une fonction acide et d'une longue chaine latérale polyméthylénique.

Ces essais sont à peine ébauchés et nous ne pouvons pas en tenir compte ici.

Conclusions des essais immunologiques

La délipidation partielle du sérum par les savons et l'éther (à pH 7,2) n'enlève pas au sérum ses propriétés antigéniques (anaphylaxie, formation de précipitines). Ces propriétés ne sont donc pas sous la dépendance des cénapses lipidoprotéidiques que brisent le savon et l'éther.

Il n'apparait, de plus, aucune spécifité nouvelle par actions simultanées des savons et de l'éther sur le sérum, or, si ces actions avaient profondément modifié chimiquement une partie même faible des protéides du sérum une spécicité nouvelle serait apparue, liée aux protéides modifiés. Ceci est un argument de plus en faveur de la non dénaturation des protéides par l'action délipidante des savons en présence d'éther.

Conclusions

CONCLUSIONS

Si l'on ajoute à du sérum une quantité suffisante d'un savon de sodium ou de potassium en solution (à un pH voisin de celui du sérum), l'acide gras du savon détache certains lipides, qui étaient liés à des protéides pour former les cénapses lipido-protéidiques du sérum.

L'acide gras se fixe à la place des lipides sur les protéides en formant des cénapses protéides-acide gras. Les lipides précipitent, mais si le savon est en excès, il remet en solution une partie des lipides.

Si l'on agite avec de l'éther le sérum préalablement additionné d'une quantité de savon suffisante pour qu'un précipité lipidique se forme, on constate que l'éther dissout ces lipides ainsi « décollés » des protéides.

L'éther, en présence de la quantité optimale de savon, enlève au sérum 80 à 90 p. 100 des lipides qu'il contient.

Le pH, la durée de contact sérum-savon-éther, la dilution, la nature de l'acide gras du savon, le vieillissement du sérum, ont une influence notable sur le phénomène.

Tous les lipides ne sont pas enlevés par l'éther en présence de savon, même lorsque la concentration en savon est optimale ; une partie des lipides est plus solidement attachée aux protéides. Les lipides qui résistent à l'action du savon sont à peu près uniquement ceux entrant dans la constitution des cénapses acidoprécipitables que Macheboeuf avait pu séparer autrefois des albumines du sérum.

Les lipides liés aux globulines en sont entièrement détachés par les savons les plus actifs tels que le ricinoléate, le linoléate ou le dibromostéarate de potassium.

Ceci nous a conduit à mettre au point une méthode permettant de délipider les globulines (en vue d'études immunologiques par exemple) sans que ces globulines soient soumises à l'action d'un réactif risquant de les dénaturer.

Si l'on délipide ainsi les globulines insolubles dans l'eau distillée (euglobulines), on constate qu'elles deviennent en majeure partie solubles dans l'eau distillée ; leur insolubilité première en l'absence de sels était donc due aux lipides qui leur étaient unis.

Lorsque l'on agite un mélange de sérum, de savon et d'éther, il persiste, pour une concentration en savon comprise entre certaines limites, un précipité blanc insoluble à la fois dans l'eau et dans l'éther ; il s'agit d'un précipité de savon de calcium formé au dépens du calcium du sérum.

L'action du savon sur le sérum ne modifie pas le pouvoir sensibilisant du sérum (anaphylaxie), ni son pouvoir antigène. Les lipides, qui sont arrachés aux protéides par le savon et l'éther, n'ont donc aucun rôle dans le déterminisme de la spécifité antigénique de ces protéides.

Nos résultats étayent fortement l'hypothèse de Machebœuf et Sandor sur la nature des liaisons qui unissent les protéides et les lipides dans les cénapses les moins stables du sérum (solvatation réciproque des chaines polyméthyléniques semblables appartenant les unes aux lipides, les autres aux protéides).

En effet, les savons sont essentiellement constitués par une longue chaîne polyméthylénique soluble dans l'eau, grâce à la fonction acide qui les unit à un cation de métal alcalin. On conçoit bien que ces chaînes polyméthyléniques solubles dans l'eau arrivant au contact des protéides du sérum s'accolent aux chaînes polyméthyléniques que ces protéides contiennent dans leur molécule. Lorsque le savon est en excès par rapport à celles de ces chaînes qui étaient libres de toute liaison préalable, l'excès de savon déplace des lipides qui étaient accolés aux protéides par d'autres portions de leurs chaînes polyméthyléniques. Les lipides détachés des protéides précipitent en entrainant dans le précipité une partie de l'excès de savon qui s'accole à leurs chaînes polyméthyléniques.

Si enfin le savon est en grand excès par rapport aux chaînes polyméthyléniques totales des protéides, cet excès de savon s'unit aux lipides déjà précipités en formant avec eux des complexes hydrosolubles.

Cette conception rend très bien compte de toutes les modalités du phénomène étudié dans ce travail.

Dans certaines cénapses lipidoprotéidiques insensibles aux actions combinées des savons et de l'éther, les lipides sont attachés aux protéides par des liaisons beaucoup plus stables que la simple solvatation réciproque de chaînes polyméthyléniques semblables. Pour ces cénapses, si remarquablement stables, qui sont du type de celles isolées autrefois par Machebœuf, on ne peut pas encore émettre d'hypothèse rationnelle sur la nature des liaisons protéides-lipides.

BIBLIOGRAPHIE

1. — Abderhalden. — Zschr f Phys. Chem. (1902), **37**, 495.
2. — Abderhalden et Komm. — Ueber die Anhydridstruktur des Proteins, Ibid (1924), 139, 181.
3. — Achart et Grigaut. — Cité d'après Lematte. — Revue de Médecine, Fév. 1933.
4. — Bang. — Ergebnisse der Physiol (1907-1909), **6**, 131 et **8**, 463.
5. — Bang. — Biochem. Zeits, (1918), **90**, 383.
6. — Beauverie. — C. R. Soc. Biol. (1928), **98**, 1 et 311.
7. — Biedermann. — Pfl. Arch., (1924), **202**, 223.
8. — Caminade. — Bull. Soc. Chim. Biol. (1922) **4**, 601.
9. — Charonnat. — J. Pharm. et Chim. (1935) **22**, 574.
10. — Charonnat. — J. Pharm. et Chim. (1936), **23**, 307.
11. — Chick. — Biochem. Journ. (1914), **8**, 414.
12. — Chick. — Biochem. Journ. (1914), **8**, 804.
13. — Ciaccio. — Boll della Soc. di Biol. Sperim (1926), **1**, 144.
14. — Czapek. — Ber. Bot. ges. (1919), **37**, 207.
15. — Degkwitz. — Ergebnisse der Physiol (1931), **32**, 821.
16. — Delage. — Bull. Soc. Chim. biol. (1935) **17**, 927 et (1936) **18**, 1304.
17. — Delage. — Bull. Soc. Chim. biol. (1937), **19**, 1407 et (1938), **20**, 892.
18. — Denigès et Chelle. — C. R. Ac. Sc. (1912).
19. — Devaux. — Bull. Soc. Fr. de Physique (1923) n° 183.
20. — Dœrr et Berger. — Biochem. Zeitschr. (1902), **131**, 13.
21. — Dormayer. — Pflügers Archiv. (1896), **65**, 90.
22. — Erlandsen. — Zeitsch. f. Physiol. Chem. (1907), **51**, 71.
23. — Fauré-Frémiet. — Arch. Anatomie Microsc. (1919), **11**, 457, 648.

24. — Fleitmann. — Ann. Chem. u. Pharm. **66**, 381.
25. — Freud et Joachim. — Zeitschr. f. physiol. Chemie (1902), **36**. 407.
26. — Freund et Lustig. — Biochem. Zeitschr. (1926) **167**, 355.
27. — Fuld et Spiro. — Zeitschr. f. physiol. (1909), **31**, 132.
28. — Furth et Fischer. — Bioch. Zeitschr. (1924), **154**, 1-23.
29. — Furth et Nobel. — Bioch. Zeitschr. (1902), **109**, 103.
30. — Gardner et Gainsborough. — Biochem. Journ. (1927), **11**, 141.
31. — Grigaut. — C. R. Soc. biol. (1911) **71**, 274.
32. — Grigaut. — C. R. Soc. biol. (1912), **72**, 919.
33. — Grigaut. — Soc. de Biol. (1933), **112**, 34 et Thèse Paris 1913.
34. — Guerber. — Sitzungsbericht. d. Wuezburger med. ges. (1894).
35. — Haas et Trautmann. — Zeitschr. Phys. Chem. (1923) **127**, 52.
36. — Halliburton. — Journ. of Physiol. (1886) **7**, 319.
37. — Hammarsten. — Ergebnisse der Physiol (1902), **1**, 330.
38. — Handowsky. — Arch. f. die. gesamte Physiol (1925), **210**, 35.
39. — Handowsky et Wagner. — Biochem. Zeitschr. (1911) **31**, 33.
40. — Handsteen-Granner. — Ber. d. Botan. ges. (1919), **37**, 380.
41. — Hardy. — J. Physiol. (1905), **33**, 251.
42. — Hardy et Gardiner. — Journ. of Physiol (1910) **40**, 68.
43. — Harkins. — Journ. Amer. Chem. Soc. (1917), **39**, 1848.
44. — Hartley. — Brit. Journ. Exper. Pathol. (1915) **6**, 180.
45. — Haslam. — Biochem. Journ. (1913) **7**, 492.
46. — Hattori. — Biochem. Zeitschrift (1921), **119**, 45-64.
47. — Herzfeld. — Scheveiz. Med. Wochenschr (1922), 411.
48. — Herzfeld. — Bioch. Zeitschr. (1913), **56**, 258.
49. — Hofmeister. — Arch. f. exp. Path. u. Pharm. (1888 à 1890) **24** à **28**.
50. — Hofmeister. — Zeitschr. f. physiol chemie (1884) **14**, 165.

51. — Hofmeister. — Zeitschr. f. physiol chemie (1891), **16**, 187.
52. — Hoppe Seyler. — Medizinisch Chemische Untersunch a. D. Labor f. angew. Chem., Tübingen (1867 à 1871), **2**, 215, **3**, 391, **4**, 486.
53. — Horsfall et Goodner. — Journ. of. exper. med. (1935) **62**, 485 et (1936), **64**, 583.
54. — Hougardy. — Chem. Zentralblatt (1900), **2**, 282.
55. — Jarisch. — Pfugers Arch. f. d. ges. Physiol. (1921) **186**, 299, et (1922), **194**, 337.
56. — Kauder. — Arch. f. exp. Path. u. Pharm., (1886), **20**, 411.
57. — Kijotari. — Bioch. Zeitschr. (1923), **134**, 322.
58. — Koch. — Zeitsch. f. Physiol. Chem. (1903), **37**, 181.
59. — Kumagawa et Suto. — Biochem. Zeistchr. (1908), **8**, 213-250-340-347.
60. — Landsteiner. — The specifity of serological réactions. 1 vol. Baillière, Tindall et Cox, 178 p. (London 1936)
61. — Langmuir. — Journ. Amer. Chem. Soc. (1917), **39**, 1848.
62. — Lepeschkin. — Biochem. Zelitschr. (1926), **171**, 126.
63. — Liebermann. — Pflügers Arch. (1891), **50**, 55 et (1893), **54**, 573.
64. — Liebermann. — Ber. d. d. chem. gesellsch. **183**, 1804.
65. — Linderstrom-Lang et Schmidt. — C. R. Laborat. Carlsberg (1930), **18**, n° 3, 1.
66. — Long et Gephart. — Am. Chem. Soc. (1908), **30**, 881-902 et 1312-1319.
67. — Machebœuf. — Bull. Soc. Chim. biol. (1926), **7**, 464.
68. — Machebœuf. — Etat des lipides dans la matière vivante. — Les cénapses et leur importance biologique, 1 vol. Paris 1937, Hermann édit.
69. — Machebœuf. — Thèse Doctorat es Sciences, Paris 1928.
70. — Machebœuf et Januszkiewicz. — Bull. Soc. Chim. Biol. (1937), **19**, 694.
71. — Machebœuf et Sandor. — Bull. Soc. Chim. biol. (1932) **14**, 1168.
72. — Machebœuf et Tayeau. —C. R. Ac. Sc. (1938), **206**, 860.

73. — Machebœuf et Tayeau. — C. R. Soc. Biol. (1938) sous presse, n° 1.
74. — Machebœuf et Tayeau. — C. R. Soc. Biol. (1938) sous presse, n° 2.
75. — Machebœuf, Tayeau et Battut. — C. R. Soc. Biol. (1938) sous presse.
76. — Malerba. — Acad. de Scienze Fisiche et Med. d' Napoli, Fasc. 3,5 (1894).
77. — Marcus Emil. — Zeitschr. f. physiol. Chemie (1899) **28**, 559.
78. — Mayer et Terroine. — C. R. Soc. Biol. (1907), **62**, 317.
79. — Metzger. — Thèse médecine, Strasbourg (1932).
80. — Mœrner. — Zeitschr. Phys. Chem. (1902), **34**, 207.
81. — Nerking. — Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol (1902), **85**, 330.
82. — Okabe. — Journ. of. Bioch. (1928), **8**, 459.
83. — Oppenheimer. — Verh. d. Berl. physiol. ges. (1902).
84. — Ostwald. — Zeitschr. f. physik Chemie (1908), **62**, 512.
85. — Panum. — Wirchow. Archiv. 3-1, 251 (1851).
86. — Parat. — Arch. Anatomie Microsc. (1929), **24**, 73-256.
87. — Partington. — Chem. Soc. (1911), **99**, 313-318.
88. — Piettre. — C. R. Ac. Sc. (1928), **186**, 1657 et **192**, 894.
89. — Pohl. — Arch. f. exp. Path. u. Pharm. (1886), **20**, 246.
90. — Porges et Neubauer. — Biochem. Zeitschr. (1908), **7**, 152-177.
91. — Porges et Spiro. — Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. (1903), **3**, 277.
92. — Quinnan. — Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. (1904), **5**, 95.
93. — Ramon Y. Cajal. — Trab. des. Labor. de Invest. Biol (1915), **12**, 127-227.
94. — Robertson. — Journ. of. Biol. Chemistry (1913), **13**, 325.
95. — Roche (A) et Marquet. — C. R. Soc. Biol. (1935), **119**, 1147 à 1149.
96. — Roche (A) et Bracco. — Bull. Soc. Chim. biol. (1934), **16**, 1479-1497.

97. — Samuely. — Oppenheimer Handb. d. Biochchemie (1904), **1**, 286.
98. — Sandor. — Thèse de Doctorat es Sciences, Paris (1933).
99. — Schmidt. — Reichters. u. du Bois-Raymonds Archiv. (1862).
100. — Schultz. — Zeitschr. Phys. Chem. (1902), **34**, 207.
101. — Sœrensen. — C. R. Lab. Carlsberg (1923), **15**, n° 9.
102. — Sœrensen. — Journ. Amer. Chem. Soc. (1925), **47**, 467.
103. — Sœrensen. — C. R. Lab. Carlsberg (1930), **18**, n° 5.
104. — Svedberg. — Kolloidzeitschr. 36 b. (Zsigmondy Festschrift) 53 (1925).
105. — Svedberg. — Journ. Amer. Soc. (1926), **48**.
106. — Svedberg. — Zeitschr. f. physik. chem. (1926), **121**, 67 et **127**, 51.
107. — Svedberg et Sœgren. — Journ. Amer. Chem. Soc. (1930), **52**, 2855.
108. — Szymonovicz. — Lehrbuch der Histologie und der Microskopischen Anatomie, Leipzig (1924).
109. — Theorell. — Biochem. Zeit (1926), **175**, 297.
110. — Tronsegaard et Koudahl. — Zeitsch. f. Physiol. Chem. (1926), **153**, 93 et 111.
111. — Valette et Cavier. — Bull. Soc. Chim. biol. (1938), **20**, 1256.
112. — Walter. — Biochem. Zeitsch. (1921), **122**, 86.
113. — Weyl. — Zeitschr. f. physiol. chemie (1877), **1**, 72.
114. — White. — Proc. of the physiol. Soc. (1908), VI in the Journal of Physiology 38.
115. — Willstaetter et Rohdewald. — Zeitschr. f. Physiol. Chem. (1934), **225**, 103.
116. — Windauss. — Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiologische chemie (1910), **67**, 174.
117. — Young. — Proc. Royal Soc. Lond. (1922), B. **93**, 15.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 1

CHAPITRE I

ETUDE HISTORIQUE ET CRITIQUE 5
Les Protéides du sérum sanguin 7
Fractionnement des globulines 8
Fractionnement des albumines 10
Comparaison des albumines et des globulines 10
Les substances lipoïdiques du sérum sanguin 13
Stabilité en phase aqueuse des lipides du sérum 15
Théories sur le mode d'union des lipides aux protéides . 20

CHAPITRE II

ETUDE EXPERIMENTALE 25
Action des savons sur le sérum sanguin 27
Etude des cénapses formés par les protéides et les acides gras 33
Conclusions du Chapitre II 37

CHAPITRE III

ETUDE DE L'INFLUENCE DES DIVERS FACTEURS 39
Influence de la quantité de savon ajoutée au sérum 41
Influence du pH 51
Influence du temps de contact 61
Influence de la dilution 73
Comparaison de l'action des divers savons 75
Influence du vieillissement du sérum 90
Essais effectués sur divers sérums (hommes et animaux) 94
Conclusions du Chapitre III 96

CHAPITRE IV

ACTION DES SAVONS SUR LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES CONTENUES DANS LES DIVERSES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM ... 99
Action sur les globulines 99
Méthode de délipidation des globulines 104
Recherches sur les euglobulines 107
Action sur les albumines 112
Action sur les cénapses acidoprécipitables de Macheboeuf 113
Conclusions du Chapitre IV 115

CHAPITRE V

ETUDE D'UNE PETITE FRACTION INSOLUBLE DANS L'ÉTHER DU PRÉCIPITÉ FORMÉ LORS DE L'ADDITION D'UN EXCÈS DE SAVON ET D'ÉTHER A DU SÉRUM SANGUIN 119
Conclusions du Chapitre V 124

CHAPITRE VI

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES EFFECTUÉES COMME APPLICATIONS DES RECHERCHES PRÉCÉDENTES SUR L'ACTION DU SAVON SUR LE SÉRUM SANGUIN 125
Conclusions du Chapitre VI 131

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 135

Bibliographie 139

Table des matières 145

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Constitution chimique des auxines.
Rapports entre cette constitution et leur activité biologique

Vu, Bon à imprimer :

Bordeaux, le 10 Janvier 1939
Le Président,

GENEVOIS.

Vu et approuvé

Bordeaux, le 10 Janvier 1939.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MERCIER.

Bordeaux, le 12 Janvier 1939.

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie
de Bordeaux

BOUSSAGOL